



Universidad de Salamanca
Departamento de
Microbiología y Genética



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER



Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE CÁNCER

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE VRK1, UNA QUINASA HUMANA CON UN PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL SUPRESOR DE TUMORES p53

**Memoria presentada para optar al título de Doctor en Biología por
Francisco M. Vega Moreno, Septiembre 2004**

D. PEDRO A. LAZO-ZBIKOWSKI, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (C.S.I.C.)

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Caracterización de la función de VRK1, una quinasa humana con un papel en la regulación del supresor de tumores p53” presentada por el licenciado D. FRANCISCO MANUEL VEGA MORENO para optar al grado de doctor en Biología ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 30 de Septiembre de 2004.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski

Esta memoria ha sido realizada siendo **Francisco Manuel Vega Moreno** beneficiario de una beca de la **Fundación Ramón Areces** para la realización de la tesis doctoral (2000-2004).

La investigación en el laboratorio ha sido financiada por proyectos de:

- Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2000-0169, SAF2004-2900)
- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-PI02-0585)
- Junta de Castilla y León (CSI18-03)
- Fundación de Investigación Médica MMA
- Fundación Memoria Samuel Solórzano Barruso.

A mis padres,
Juan y Carmen.

A ti.

—ÍNDICE—

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer	3
2. Señalización en cáncer	4
2.1. Respuesta a señales proliferativas	5
2.2. Control del ciclo celular y de la estabilidad genómica	6
2.3. Potencial replicativo	6
2.4. Apoptosis	7
2.5. Metástasis y angiogénesis	7
3. Quinasas y cáncer	7
4. El “Quinoma humano”: Familia de quinasas VRK	8
4.1. VRK1 (“Vaccinia-related kinase 1”)	12
5. El supresor de tumores p53	14
5.1. Estructura de p53	15
5.2. Funciones de p53	16
5.2.1. p53 y la parada de ciclo celular	16
5.2.2. p53 y apoptosis	19
5.2.3. Otras funciones de p53	21
5.3. Regulación de la actividad de p53. Estabilidad proteica	21
5.4. Modificaciones postraduccionales en p53	24
5.5. p53 y cáncer	30

OBJETIVOS	33
-----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST	37
2. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a epítipo 6xHis	37
3. Ensayos quinasa de VRK1	38
4. Tinción con azul de Coomassie	38
5. Generación de vectores de ADN recombinantes	38
6. Mutagénesis dirigida	38
7. Cultivo celular	39
8. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo	39
9. Electroforesis SDS-PAGE y “Western blot”	40
10. Inmunoprecipitación	40
11. Inmunofluorescencias	41
12. Medida de la actividad transcripcional con gen reportero de Luciferasa	41
13. Análisis mediante citometría de flujo (FACS)	42
14. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	42
15. Ensayo de unión entre mdm2 y proteína de fusión GST-p53	43
16. Ensayo de focos en NIH/3T3	43
17. Experimentos de supresión de la expresión con RNAi	44
18. Video-microscopía	44

19. Medida de proliferación y viabilidad celular	44
20. Amplificación por PCR de ARNs de VRK de ratón	44
21. Reactivos y estimulaciones	45
22. Inmunohistoquímica de tumores	45
Tabla 1. Construcciones de ADN	46
Tabla 2. Mutaciones puntuales	48
Tabla 3. Líneas celulares	49
Tabla 4. Anticuerpos	50
Tabla 5. Oligonucleótidos	51

RESULTADOS

1. Características de VRK1 endógena	55
1.1. VRK1 se expresa en diversas líneas celulares humanas	55
1.2. VRK1 se expresa por igual en todas las fases del ciclo celular	55
2. VRK1 y p53	58
2.1. La cinética de la fosforilación de p53 por VRK1 es consecuente con una acción in vivo	58
2.2. VRK1 no fosforila a p53 en la región carboxilo-terminal in vitro	59
2.3. La fosforilación de p53 por VRK1 impide su unión con MDM2 in vitro	59
2.4. La sobre-expresión de VRK1 provoca la estabilización de p53 exógenamente expresado	62
2.5. VRK1 estabiliza a p53 por un mecanismo independiente de Mdm2	67
2.6. Posible cooperación de VRK1 con otras quinasas en la activación de p53	69
2.7. VRK1 y el regulador de p53 Mdm4 (MdmX)	72
2.8. VRK1 promueve la acetilación de p53 por el coactivador p300	74
2.9. VRK1 promueve la fosforilación y acetilación de p53 endógeno	76
3. VRK1 y su papel en tumorigénesis	78
3.1. La sobre-expresión de VRK1 no tiene fenotipo de supresión tumoral dependiente de p53	78
3.2. VRK1 no actúa como un supresor de tumores per se	79
3.3. La supresión de la expresión de VRK1 por RNAi genera un fenotipo de anomalías en proliferación	80
4. La regulación de la actividad de VRK1	82
4.1. La expresión de VRK1 no se ve afectada por activadores de p53	82
4.2. La actividad quinasa de VRK1 es esencial para su estabilidad proteica	83
4.3. La auto-fosforilación de VRK1 no afecta a su actividad enzimática in vitro	85
4.4. La sobre-expresión de p53 regula negativamente la expresión de VRK1 exógeno	85
5. El grupo de quinasas VRK en el ratón	87
5.1. Identificación de la familia VRK de quinasas en ratón	87
5.2. Expresión de proteínas de la familia VRK durante el desarrollo hematopoyético murino	89
6. VRK1 en cáncer de cabeza y cuello	91

DISCUSIÓN

La quinasa endógena. Expresión y localización	97
VRK1 y p53	98
VRK1 y su función fisiológica en la célula	107
La regulación de la actividad de VRK1	111
VRK1 en cáncer	113

CONCLUSIONES	115
---------------------------	------------

REFERENCIAS.....	117
-------------------------	------------

ABREVIATURAS.....	129
--------------------------	------------

AGRADECIMIENTOS.....	131
-----------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Cáncer es un término que da nombre a un conjunto de enfermedades distintas y diversas, caracterizadas todas ellas por una proliferación incontrolada de células que se diferencian del tipo celular normal del que proceden. Esta divergencia es debida a la acumulación de fallos en los mecanismos que regulan la división celular y/o la muerte celular programada o apoptosis, dando lugar a células que se dividen más y más rápidamente o que escapan a la muerte que deberían sufrir a causa de estas irregularidades (Hanahan and Weinberg, 2000). Los genes que se ven afectados son los que regulan bien la tasa de proliferación celular o bien la tasa de mortalidad celular, alterándose así la homeostasis normal de los tejidos (Futreal et al., 2004). El resultado, por tanto, es la acumulación de células anormales que no obedecen las restricciones propias de las células que forman parte de los tejidos en los órganos prulicelulares, sufriendo un proceso de diferenciación incompleta o des-diferenciación y llegando a invadir tejidos adyacentes (Kufe et al., 2003). Debido a las especiales características de invasividad que pueden adquirir, estas células son capaces de alcanzar la circulación sanguínea o linfática, y adherirse y extravasarse a un nuevo tejido en otras zonas del organismo, colonizándolo y estableciendo metástasis. La adquisición de la capacidad de invadir tejidos circundantes o distantes sanos es la característica que diferencia a los cánceres de los tumores benignos. La invasión local provoca daños en los tejidos afectados por compresión, destrucción e impedimento de la función normal del órgano. La colonización de otros órganos disemina el daño y dificulta el tratamiento del cáncer. En última instancia la culminación de este proceso lleva a la muerte del organismo.

Los procesos cancerígenos se dan en todo el reino animal. En humanos es una de las primeras causas de mortalidad habiendo provocado por ejemplo más de 3 millones y medio de muertes en todo el mundo en el año 2000 (Ferlay et al., 2001). De ahí la importancia del estudio de los procesos de tumorigénesis.

El cáncer es una enfermedad genética de modo que, ya sea espontáneamente, por predisponibilidad genética, por algún elemento ambiental específico o combinación de cualquiera de los tres, lo que resulta en última instancia es la acumulación secuencial de mutaciones en el ADN (Lengauer et al., 1998). Estas mutaciones afectan a genes que controlan la proliferación celular, principalmente oncogenes y genes supresores de tumores o a genes implicados en reparación del ADN, que aumentan la tasa de mutación favoreciendo la acumulación de mutaciones en los primeros.

Los procesos que se encuentran defectuosos en las células que darán lugar a un tumor son los mismos presentes en todas las células del organismo y son los que controlan las funciones vitales normales de estas. De ahí que el estudio de los procesos tumorales a nivel molecular haya generado y siga generando un conocimiento fundamental sobre los mecanismos implicados en la vida de una célula y su relación con otras para formar un organismo pluricelular.

2. Señalización en cáncer

El proceso mediante el cual la actividad celular se coordina con cambios en el ambiente a través de diversas vías que reciben y procesan señales tanto del ambiente externo como de diferentes regiones del interior celular es lo que llamamos señalización (Jordan et al., 2000). Esas vías no son lineales, sino que forman parte de una intrincada red en la que los principios básicos de la transmisión de información son el ensamblaje regulado de complejos proteicos, con frecuencia recolocando elementos entre distintos compartimentos celulares, seguido por la activación o inhibición de actividades enzimáticas. Lo que se provoca en último término son cambios en las funciones celulares, y es la combinación de estas funciones modificadas lo que constituye la respuesta fisiológica concreta en cada caso.

Diversas rutas de señalización se interrelacionan para regular el crecimiento, proliferación y supervivencia celulares. La alteración en esas rutas

puede traer como consecuencia la aparición de un proceso tumoral. El proceso de transformación maligna de un grupo de células hasta dar lugar a un tumor se produce en pasos discretos, la mayoría de los cuales se corresponde con la alteración de un gen específico. Hay evidencias de que existen un número limitado de rutas moleculares, cuya alteración da lugar a la mayoría de los cánceres (Hahn and Weinberg, 2002). La mayoría de las mutaciones asociadas a cánceres interrumpen mecanismos homeostáticos esenciales que regulan la proliferación y supervivencia celulares. El conocimiento en detalle de las rutas moleculares que regulan estos procesos es esencial para descubrir esas alteraciones.

Algunos de los procesos principales implicados en la transformación y progresión tumorales, así como algunas de las vías de señalización afectadas en cada caso son:

2.1. Respuesta a señales proliferativas.- En el organismo, diferentes factores de crecimiento y otras señales regulan el crecimiento y división celulares. Estas señales son transmitidas desde la superficie celular por diversas vías de señalización que la conectan con la maquinaria interna que controla estos procesos, provocándose cambios de la expresión génica que determinarán la respuesta adecuada a las señales proliferativas concretas. Mutaciones activadoras de muchos de los genes implicados en esta regulación son oncogénicas y tienen como resultado la adquisición por las células de la capacidad de dividirse sin atender los controles a los que están sometidas las células en el seno de los tejidos en los organismos pluricelulares.

Mayormente estas señales son factores de crecimiento o citoquinas que se unen y activan a receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) o en otros casos a receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR) (Schlessinger, 2000). A partir de un receptor activado se pueden activar diversas vías de señalización. Entre ellas está la ruta Ras-MAPK (Downward, 2003; Johnson and Lapadat, 2002; Shields et al., 2000), la activación de la fosfatidil-inositol 3

quinasa (PI3K)-AKT (Vivanco and Sawyers, 2002), la vía de las proteínas JAK/STAT (Kisseleva et al., 2002) o la activación de otras MAP quinasas como la “c-jun N-terminal Kinase” (JNK) (Davis, 2000; Weston and Davis, 2002) que llevarán a la expresión de diversos genes implicados en el control de la proliferación y supervivencia celulares así como apoptosis.

2.2. Control del ciclo celular y de la estabilidad genómica.- La decisión entre permanecer en un estado quiescente o entrar en el proceso de crecimiento y división celular es regulada por diversas vías de señalización que integran diversos estímulos del entorno y su propio programa de diferenciación. Las vías de los supresores de tumores p53 y RB, por ejemplo, controlan la progresión del ciclo celular y están mutadas en la gran mayoría de los cánceres (Hollstein et al., 1991; Sellers and Kaelin, 1997). Las rutas de Ras-MAPK y TGF- β /SMADS participan también en estos procesos (Massague, 2000). RB tiene un papel central en el inicio del ciclo de división celular en la transición G1/S (Weinberg, 1995). Además durante todo el ciclo celular existen puntos concretos en los que las condiciones favorables o el correcto progreso de la división celular son comprobadas (“checkpoints”). Durante la fase S y la progresión G2/M la integridad y ausencia de daños en el genoma es asegurada antes de continuar con la división celular por medio de diversas vías de transducción de señales en las que esta implicada de manera importante otra vez la proteína p53 ((Albrechtsen et al., 1999; Melo and Toczyski, 2002; Schwartz and Rotter, 1998) y otras como ATM/ATR (Shiloh, 2003) o BRCA (Tutt and Ashworth, 2002). Mutaciones en proteínas claves de estas vías de señalización ayudan a la división incontrolada de las células cancerosas, provocando a su vez un aumento de la inestabilidad genómica en estas células, con la consiguiente acumulación de más mutaciones conducentes al fenotipo tumoral (Sherr, 2004).

2.3. Potencial replicativo.- En humanos, el mantenimiento de los telómeros sirve como control del número de divisiones celulares, regulando así la

vida de la célula. La alteración de este mecanismo de modo que se impide el acortamiento normal de los telómeros tras cada división celular es un fenómeno común en las células cancerosas (Blasco, 2003). La activación de proteínas como TERT, implicada en este proceso de alargamiento de los telómeros, es una alteración presente en el 85-90% de las células cancerosas (Shay et al., 2001).

2.4. Apoptosis.- Las células cancerosas suelen, además de desreglar la división celular, adquirir resistencia a la muerte celular programada o apoptosis. Esto se consigue alterando tanto vías que conducen a la apoptosis, inhibiéndolas, como rutas o proteínas antiapoptóticas, activándolas de forma descontrolada. p53 juega un importante papel en la inducción de apoptosis en respuesta a diferentes estreses, dirigiendo la expresión de proteínas proapoptóticas como BAX (Shen and White, 2001). Mutaciones de p53 en cáncer hacen fallar estos mecanismos. La vía de PI3-K, que regula la proliferación y supervivencia celulares, esta también frecuentemente alterada para potenciar sus resultados antiapoptóticos (Vivanco and Sawyers, 2002).

2.5. Metástasis y angiogénesis.- Fenómenos como la pérdida de adhesión celular y extravasación se ven alterados en las células cancerosas que provocan metástasis. La vía de TGF- β y de proteínas de adhesión como las E-cadherinas, así como MAP quinasas, son algunas de las implicadas en estos procesos (Chambers et al., 2002; Steeg, 2003). De igual forma es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos para que los tumores puedan alcanzar cierto tamaño, para lo cual se ha de adquirir la capacidad de atraer células endoteliales (Hanahan and Folkman, 1996).

3. Quinasas y cáncer

Las quinasas son enzimas que catalizan la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina en proteínas celulares

específicas. Con esta fosforilación se pueden controlar propiedades como la actividad enzimática del sustrato, su localización celular, su interacción con otras proteínas y moléculas o su degradación (Hanks and Hunter, 1995; Hanks et al., 1988; Johnson and Lapadat, 2002; Yaffe and Elia, 2001). Las proteínas quinasas median en gran parte de las rutas de transducción de señales de las células eucariotas, siendo la modificación postraducciona favorita para situaciones donde se necesita una rápida modulación de la actividad de factores de transcripción en respuesta a señales procedentes de receptores de la superficie celular (Karin and Hunter, 1995). Modificando la actividad del sustrato, controlan procesos como transcripción génica, progresión del ciclo celular, metabolismo, reorganizaciones del citoesqueleto y movimiento celular, apoptosis o diferenciación. Es por ello que la desregulación de proteínas quinasa claves juega un papel fundamental en desordenes fisiológicos como las enfermedades humanas (Hunter, 1987). Muchas de las proteínas oncogénicas conocidas son quinasas (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Futreal et al., 2004; Hunter, 1997; Yang et al., 2003).

4. El “Quinoma humano”: Familia de quinasas VRK

Recientemente, como complemento a la secuenciación del genoma humano, se ha hecho un esfuerzo por catalogar todas las quinasas humanas en lo que se denominó “Kinoma humano” (Manning et al., 2002) haciendo uso de las bases de datos genómicas disponibles, los ADNc y las EST (“expressed sequence tags”) introducidas en el “GenBank”. Se identificaron así 518 putativas quinasas codificadas por el genoma humano, 71 de ellas no descritas hasta ese momento. Estas se clasificaron filogenéticamente en 8 grupos, cada uno de ellos divididos en varias subfamilias (Fig. 1A).

En esta clasificación, dentro del grupo de las caseína quinasas de tipo I (CKI) se encuadra la familia de quinasas VRK (del inglés “vaccinia-related kinases”) (Fig. 1B). Es una familia solo distantemente relacionada en secuencia

con las caseína quinasas, con las que comparten el mayor parecido en el dominio catalítico (Lopez-Borges and Lazo, 2000) (Fig. 2).

La familia VRK consta de tres miembros en humanos: VRK1, VRK2 (con dos formas distintas A y B, generadas por maduración alternativa de su ARN mensajero) y VRK3 además de un pseudo gen de VRK3 del que no se ha detectado expresión (Fig. 3).

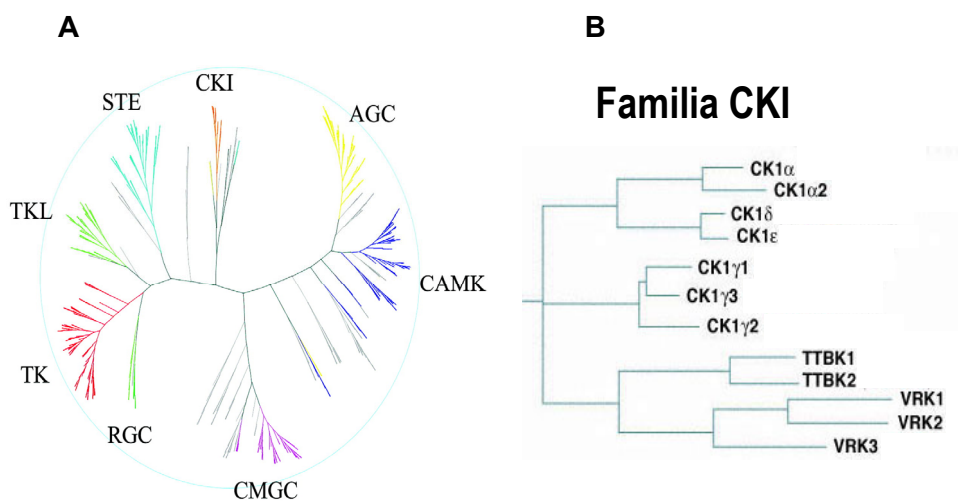


Figura 1. VRK1 en el quínoma humano. **A)** Clasificación en grupos de las quinasas humanas según (Manning et al., 2002). **B)** Familia de las caseína quínasa tipo I dentro del quínoma humano.

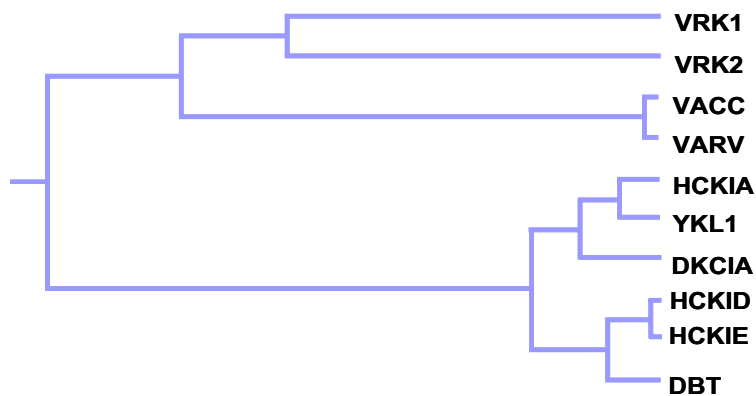


Figura 2. Relación de VRK1 con las caseína quinasas tipo I. Dendograma mostrando las relaciones filogenéticas entre las quinasas VRK y las caseína quinasas tipo I.

Inicialmente estas quinasas fueron identificadas por su homología con la quinasa del virus *vaccinia* B1R (Nezu et al., 1997). Esta es una quinasa de expresión temprana durante la infección viral y con un papel esencial en la replicación vírica (Banham and Smith, 1992; Lin et al., 1992). VRK1 tiene un 40% de identidad sobre 305 aminoácidos con B1R y VRK2 38,7% sobre 300 aminoácidos.

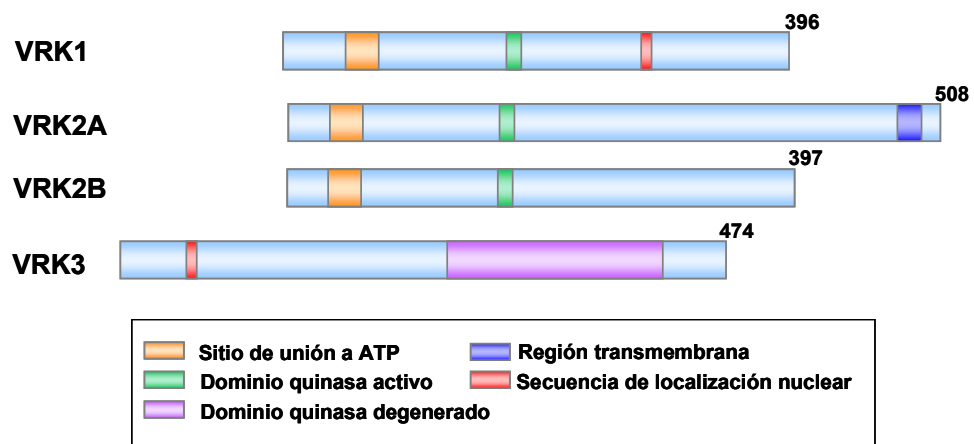


Figura 3. Estructura de las quinasas VRK. Se muestran alineadas según homología de secuencia de aminoácidos.

Sus ARN mensajeros se han detectado mediante “Northern blot” en todos los tejidos examinados, y niveles de expresión especialmente altos se encontraron en tejidos con muchas células proliferativas como en hígado fetal, testículos y timo fetal para VRK1 y además páncreas, músculo esquelético, corazón y leucocitos de sangre periférica para VRK2. También se han encontrado altos niveles de expresión en varias líneas celulares cancerosas como la de carcinoma de pulmón A549, adenocarcinoma colorectal SW480, carcinoma de Burkitt Raji, de leucemia promielocítica HL-60 o la adenocarcinoma de cérvix Hela S3 (Nezu et al., 1997). Por todas estas características se postuló que las quinasas VRK podrían estar involucradas en la regulación del crecimiento celular con un posible papel en tumorigénesis. Recientemente se ha llevado a

cabo un análisis comparativo de las proteínas de la familia VRK de mamíferos (Nichols and Traktman, 2003). Tanto VRK1 y VRK2 como VRK3 se expresan en todos los tejidos analizados en humanos y ratón pero, sin embargo, solo las dos primeras parecen tener actividad enzimática, puesto que VRK3 posee sustituciones de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de estas proteínas (Nichols and Traktman, 2003).

Existen homólogos de los genes VRK en organismos modelo. En el gusano nematodo *Caenorabditis elegans* existe un homólogo a VRK1 que es el gen *F28B12.3*, localizado en el cromosoma 2, cuyo ortólogo en el también nematodo modelo *Caenorabditis briggsae* es el gen *CBG02540* y que codifica para una proteína quinasa de 610 aminoácidos. Su función es desconocida hasta el momento pero los datos de inhibición por ARN de interferencia muestran un fenotipo letal embrionario con diversos fallos en las divisiones celulares del embrión temprano (Kamath et al., 2003) y fenotipo pos-embrionario de crecimiento lento (Simmer et al., 2003). Estos datos lo sitúan como posiblemente involucrado en eventos esenciales de la división celular.

En *Drosophila melanogaster* existe un gen de la familia, el gen *CG6386* que codifica para dos transcritos diferentes: *CG6386-RA*, *CG6386-RB* (Morrison et al., 2000). También tienen homólogos para VRK1 y VRK2 el pez cebra *Dario rerio* y el anfibio *Xenopus laevis* para los tres miembros de la familia.

La teoría propuesta es que esta familia de proteínas apareciera en organismos tan simples como los gusanos nematodos y de ahí se expandieran en la evolución hasta organismos de organización superior desde la mosca a humanos. No se han descrito miembros homólogos de la familia en levaduras, pero si se encuentran proteínas posiblemente ancestros de las actuales VRK, de las que podrían derivar estas. Este es el caso del gen *Hrr25/YPL204W* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica una isoforma de caseína quinasa de tipo I implicada hipotéticamente en daño al ADN y división celular (Ho et al., 1997). El mutante nulo para esta proteína muestra también un crecimiento lento además de otras anomalías en el ciclo celular e hipersensibilidad al

daño en el ADN. Su ortólogo en *Schizosaccharomyces pombe* es el gen *HHP1* (Dhillon and Hoekstra, 1994), un gen implicado en reparación del ADN tras irradiación gamma.

También hay miembros homólogos a esta quinasas en rata y ratón. En rata (*Rattus norvegicus*) existen homólogos para los tres miembros. Para VRK1 el gen es el LOC362779. En ratón (*Mus musculus*) también existen VRK1, 2 y 3 (Nichols and Traktman, 2003; Vega et al., 2003).

4.1. VRK1 (“Vaccinia-related kinase 1”)

La quinasa VRK1 fue descrita originariamente, junto con VRK2, por su similitud con la quinasa viral B1R (Nezu et al., 1997). La expresión ectópica de VRK1 es capaz de complementar parcialmente la deficiencia en la replicación del ADN viral del virus vaccinia mutante termosensible ts2 afectado en la quinasa B1R (Boyle and Traktman, 2004). La parte amino terminal de VRK1, en la que se encuentra su dominio catalítico, tiene similitud con el dominio catalítico de la caseína quinasa de tipo 1 δ (Lopez-Borges and Lazo, 2000), mientras el dominio carboxilo terminal no presenta homología con ninguna otra proteína conocida, e incluso difiere bastante de la parte carboxilo terminal de las otras quinasas de la familia, VRK2 y sobre todo VRK3. Teniendo en cuenta la secuencia transcrita completa, VRK1 posee una identidad de secuencia del 44% con VRK2 mientras que con VRK3 es del 33%. Si atendemos solo al dominio catalítico las identidades de secuencia son del 53% entre VRK1 y VRK2 y del 32 % entre VRK1 y VRK3.

Presenta una alta auto-fosforilación tanto en residuos de serina como de treonina, propiedad que comparte con las caseína quinasas (Flotow et al., 1990). En relación con estas, que es el grupo con el que esta distantemente relacionada, VRK1 presenta una actividad quinasa característica, ya que fosforila tanto a proteínas ácidas (fosvitina y caseína) como básicas (proteína básica de mielina “MBP” e histona 2b). Una proteína quimérica de VRK1 fusionada a la

proteína fluorescente verde GFP muestra una localización exclusivamente nuclear cuando es sobre-expresada en líneas celulares humanas (Lopez-Borges and Lazo, 2000). En cuanto a su actividad bioquímica, muestra una dependencia por cationes divalentes como Mn^{+2} , Mg^{+2} y Zn^{+2} y mayor afinidad por el $MnCl_2$ (K_m de 0.6 mM) que por el $MgCl_2$ (K_m de 2.8 mM) (Barcia et al., 2002). Otra diferencia con las caseína quinasas es que, al contrario que estas, VRK1 es capaz de usar GTP como donador de fosfato aunque con una K_m de 220 μM frente a 50 μM para el ATP.

La proteína VRK1 de ratón fue descrita con anterioridad como 51PK en referencia a su peso molecular (Zelko et al., 1998). Posee una homología con la proteína VRK1 humana del 87% (92% entre sus dominios catalíticos). Esta es una quinasa exclusivamente nuclear que muestra una extensa auto-fosforilación en residuos de serina. Su ARN mensajero se ha encontrado expresado en tres formas alternativas (carentes dos de ellas de uno o dos exones finales respectivamente) y en varios tejidos distintos, con altos niveles en testículos, bazo, pulmón e hígado (Nichols and Traktman, 2003; Zelko et al., 1998).

VRK1 también tiene una homología del 86% con la secuencia de ADN de VRK1 de rata y 41% y 33% con la secuencia de aminoácidos de las proteínas homologas en *D. melanogaster* y *C. elegans* respectivamente (según "GenCard for gene VRK1", Weizmann Institute of Science, 2003) (Fig. 4).

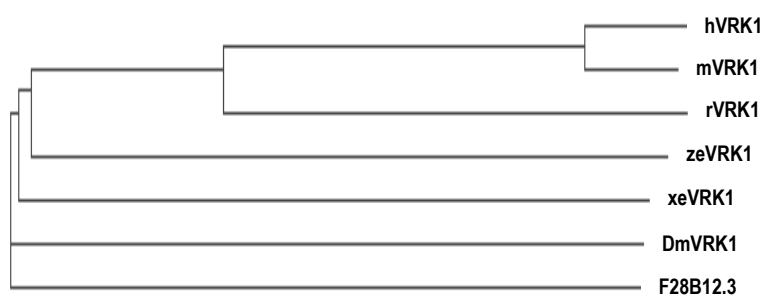


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre las proteínas VRK1 humana (hVRK1), de ratón (mVRK1), de rata (rVRK1), de pez cebra (zeVRK1), de *Xenopus* (XeVRK1), *Drosophila* (DmVRK1) y su ortóloga en *C. elegans* F28B12.3.

Como sustratos de VRK1 *in vitro* se han encontrado hasta ahora diversos factores de transcripción como p53, ATF-2 (Sevilla et al., 2004b) y c-jun (Sevilla et al., 2004a). VRK1 fosforila a p53 específicamente en el residuo treonina-18, en el dominio amino terminal de la molécula (Lopez-Borges and Lazo, 2000).

Nada es conocido en cuanto a la regulación de la actividad de la quinasa o su posible estimulación, y solo disponemos de pistas, aportadas sobre todo por datos de activación transcripcional a través de “arrays” de ADN. Así se ha descrito VRK1 como gen regulado positivamente por el factor de transcripción E2F y negativamente por p16 y pRB, situándolo como gen diana en la vía p16^{INK4A}-pRB-E2F (Vernell et al., 2003). También se ha encontrado sobre-expresado en respuesta a la expresión del proto-oncogén *c-myc* en linfocitos B (Schuhmacher et al., 2001; Shiio et al., 2003).

Existen datos en la bibliografía sobre pérdidas de heterocigosidad en marcadores anónimos flanqueando al gen de VRK1 y sugiriendo la presencia de un supresor de tumores. Estos se han encontrado en neuroblastomas (Hoshi et al., 2000), carcinomas nasofaríngeos y colorectales (Bando et al., 1999; Mutirangura et al., 1998) y en la crisis blástica de leucemias mielocíticas agudas (Sercan et al., 2000).

5. El supresor de tumores p53

El supresor de tumores p53 fue por primera vez descrito en 1979 (DeLeo et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979), aunque su papel como tal no fue descubierto hasta diez años más tarde, cuando se mostró como un eficiente inhibidor del crecimiento celular con un papel muy relevante en la supresión tumoral, ya que la pérdida de la expresión y función normal de la proteína constituía un paso importante en el proceso de transformación (Baker et al., 1989; Baker et al., 1990; Eliyahu et al., 1989; Munroe et al., 1988).

El gen *TP53* codifica para una proteína de 53 kilodaltons de peso molecular y 393 aminoácidos cuya actividad principal es la de factor de transcripción que transactiva a genes a través de su unión a secuencias consenso específicas (el-Deiry et al., 1993; Kern et al., 1991).

Existen dos genes que codifican proteínas estructuralmente relacionadas con p53 que son *TP73* y *TP63*. Ambos actúan también como factores de transcripción y formas dominantes negativas se encuentran abundantemente en tumores aunque su papel como supresores de tumores es discutido (Courtois et al., 2004; Melino et al., 2003).

5.1. Estructura de p53

La proteína se puede dividir en distintos dominios funcionales (Fig. 5). Por la región N-terminal o dominio de transactivación (aa 1-50) p53 interacciona con proteínas coactivadoras de la transcripción como p300, TFIID, TBP o TAF40 además de con proteínas reguladoras como Mdm2. Esta zona es susceptible de recibir distintas modificaciones postraduccionales, sobre todo fosforilaciones en residuos de serina y treonina.

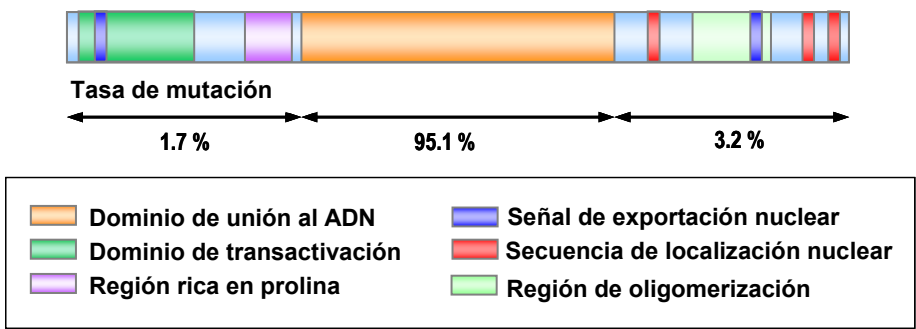


Figura 5. Estructura de la proteína p53. Se muestran los distintos dominios y la tasa de mutación encontrada en cánceres en distintos fragmentos.

Después se encuentra una región rica en residuos de prolina (aa 60-97) que forman dominios de unión a motivos SH3. La región central (aa 100-293)

contiene el motivo de unión a ADN que reconoce y se une a secuencias diana específicas. Es la región más conservada evolutivamente entre especies y en ella se encuentran en torno al 95% de las mutaciones de p53 en cáncer (Hainaut and Hollstein, 2000). Por último, la zona carboxilo terminal (aa 300-393) contiene una región flexible de unión a la parte central de la molécula (aa 300-325) y un dominio de oligomerización (aa 319-360) a través de el cual interaccionan distintas moléculas de p53 para formar un tetrámero, activo como factor de transcripción (Clore et al., 1994). También en la parte final de la molécula existe un dominio formado por residuos básicos (aa 363-393) con función reguladora menos clara y susceptible de varias modificaciones postraduccionales como ubiquitinación, sumoilación y acetilación. p53 interacciona a través de la región carboxilo terminal con proteínas como 14-3-3 σ o el coactivador TBP (May and May, 1999).

5.2. Funciones de p53

p53 actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes implicados en reparación de ADN, mantenimiento de la integridad genómica, parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia y diferenciación, entre otros procesos (Vogelstein et al., 2000; Vousden and Lu, 2002). En general p53 media la respuesta frente a diversos tipos de estrés al que las células se ven sometidas, evitando la acumulación de daños en el ADN y la proliferación y crecimiento de las células con el genoma alterado por mutaciones. Entre estos estreses se encuentran el daño al ADN, la activación de oncogenes, la hipoxia, el acortamiento de los telómeros o la depleción de ribonucleótidos. Durante el desarrollo tumoral se producen muchos de estos estreses, de modo que se provoca una activación de p53 cuyo efecto final será, generalmente, la inhibición del crecimiento celular o la entrada de las células en apoptosis, impidiéndose de ese modo la progresión tumoral (Fig. 6).

5.2.1. p53 y la parada de ciclo celular

p53 está implicado en la parada de ciclo celular sustancial a prácticamente todos los “checkpoints” conocidos que previenen la replicación del ADN y la mitosis en las células con su genoma dañado, o cuando las condiciones no son favorables (Schwartz and Rotter, 1998; Sionov and Haupt, 1999). El mecanismo mediante el cual se produce esta parada de ciclo en respuesta a daño al ADN depende también del inductor específico del daño (Attardi et al., 2004).

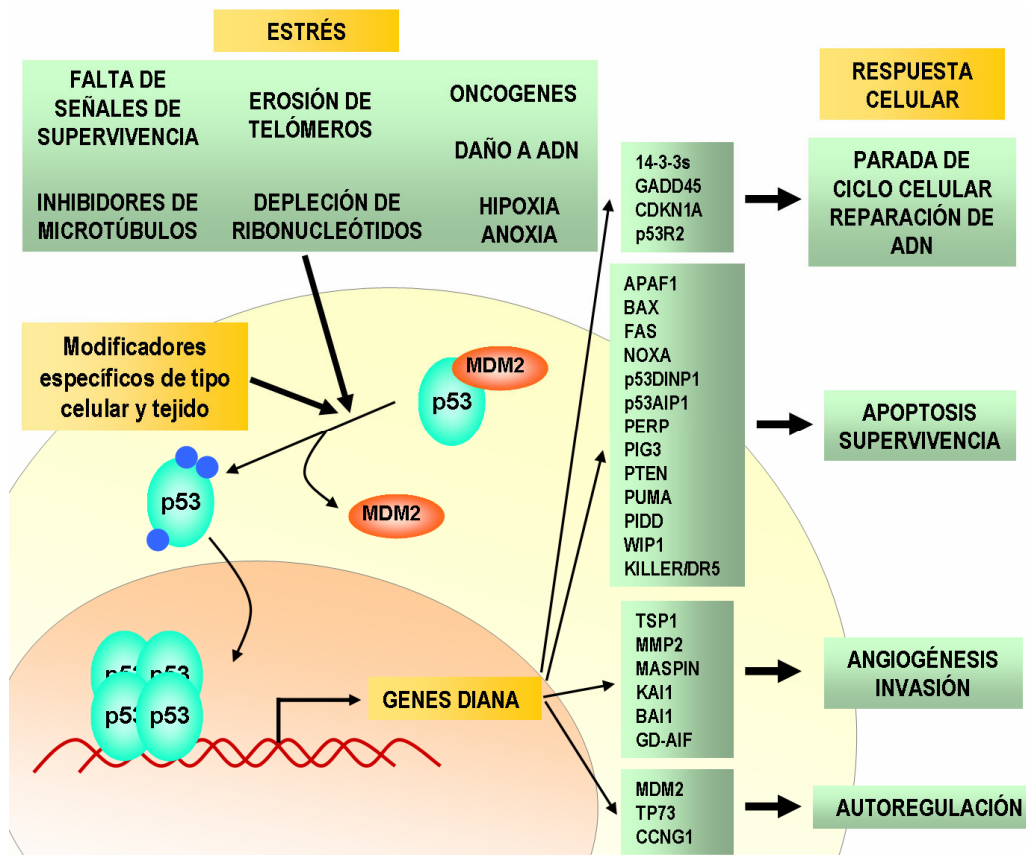


Figura 6. Activación de p53 y respuesta celular. Tras su activación por diversos estreses, p53 promueve la transcripción de diversos genes diana que desencadenarán en cada caso una respuesta celular específica. Se muestran los genes de respuesta a p53 mejor establecidos según (Vousden and Lu, 2002).

p53 media la parada, normalmente transitoria, en la fase G1 del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN que permite la reparación del daño antes de la progresión a fase S. El p53 activado promueve la expresión de p21^{WAF1/Cip1}, un inhibidor de CDKs (Di Leonardo et al., 1994). Este inhibe la acción de los

complejos ciclina A, E/CDK2, encargados de fosforilar a la proteína del retinoblastoma pRb. En su estado hipofosforilado, pRb secuestra al factor de transcripción E2F, reprimiendo la expresión de genes diana de E2F requeridos para la transición a fase S del ciclo celular (Classon and Harlow, 2002). La expresión de proteínas oncogénicas aumentan los niveles de p16^{INK4a} y p19^{ARF} (p14^{ARF} en humanos) actuando también sobre Rb y p53 y provocando una parada del ciclo celular (Lloyd, 2000) (Fig. 7).

p53 también participa en la parada del ciclo celular en la transición G2/M transactivando la expresión de los genes diana de p53 14-3-3 σ (Chan et al., 1999; Hermeking et al., 1997), GADD45 (Wang et al., 1999) y otra vez p21^{WAF1/Cip1} (Chan et al., 2000). El mecanismo implica la inhibición de la actividad ciclina B1/cdc2, esencial para la transición G2/M, mediante varios mecanismos entre los que se encuentran el secuestro por parte de la proteína 14-3-3 σ de la fosfatasa cdc25, encargada de defosforilar al complejo cycB1/cdc2, hipofosforilado en su estado activo y la inhibición de la actividad y expresión de cdc2 (Innocente et al., 1999; Taylor et al., 1999b) (Fig. 7).

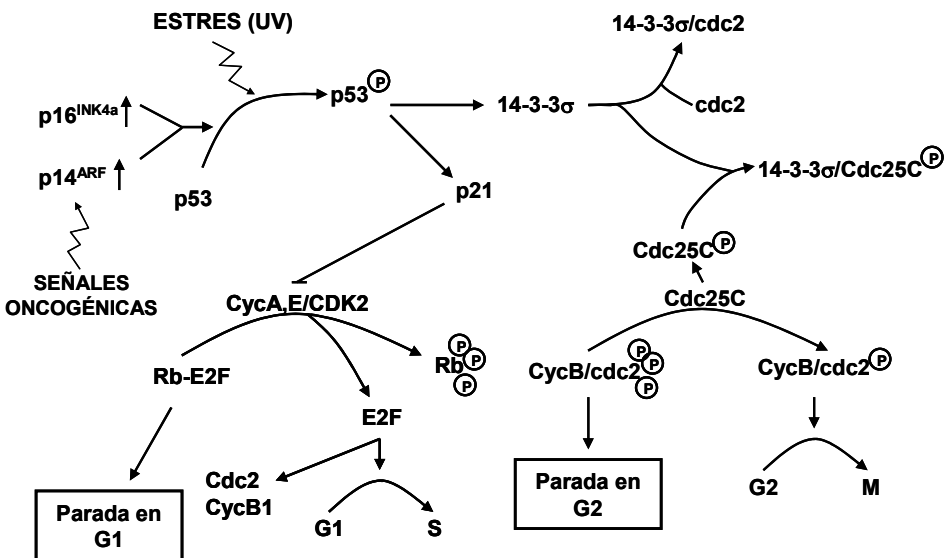


Figura 7. Regulación del ciclo celular por p53. Tras su activación, p53 puede promover parada tanto en G1 como en G2 en respuesta a distintos estreses como daño al ADN, para salvaguardar la estabilidad genómica.

Por otra parte, p53 ha sido también implicado en un “checkpoint” mitótico que previene la endoreplicación y otro que previene la reentrada en fase S (Nayak and Das, 2002; Stewart et al., 1999; Taylor et al., 1999a) además de en un checkpoint premeiótico (Schwartz and Rotter, 1998).

5.2.2. p53 y apoptosis

La apoptosis en las células se produce generalmente en respuesta a un estrés celular grave que lleva a la expresión de proteínas de la familia de Bcl2 (Cory and Adams, 2002). Estas señalizan hacia la mitocondria, a partir de la cual se produce una posterior liberación de factores apoptóticos como citocromo C. Esta liberación conduce a la activación de una cascada de proteólisis por proteínas caspasas desde las iniciadoras (caspasa 9) a las ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) que desencadenan todo un proceso de fragmentación del ADN y desorganización celular que en último término lleva a la muerte de la célula afectada sin afectar a las que la rodean (Green, 2000). Esto ocurre en la llamada vía intrínseca de activación apoptótica, en contraposición con la denominada vía extrínseca, que desencadena el proceso a partir de la activación de receptores de muerte específicos y generalmente independientemente de la mitocondria y de la activación de p53 (Ashkenazi, 2002; Danial and Korsmeyer, 2004). También se puede producir apoptosis por fenómenos independientes de la activación de caspasas (Jaattela, 2004).

p53 promueve la muerte por apoptosis de las células sometidas a un estrés severo. La actividad apoptótica dirigida por p53 es mediada por mecanismos dependientes e independientes de la función transactivadora de la expresión génica como factor de transcripción (Haupt et al., 1995). Varios de los genes inducidos por p53 pueden promover la apoptosis. Entre los productos de estos genes se encuentran proteínas proapoptóticas como BAX, que promueve la apoptosis facilitando la salida de la mitocondria del citocromo C y AIF (del ingles “apoptosis-inducing factor”) (Cregan et al., 2004; Narita et al., 1998; Susin et al., 1999) o el factor activador de proteasas activadoras de la apoptosis Apaf-1

(Moroni et al., 2001). También p53 activa la expresión de genes implicados en la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como PIG3, que activan apoptosis por la vía intrínseca (Polyak et al., 1997). Algunos de los genes transactivados por p53 son genes para receptores de membrana implicados en muerte celular por una vía independiente de la mitocondria (vía extrínseca). Entre estos esta por ejemplo el receptor de muerte Fas/Apo-1/CD95 (Muller et al., 1998), con importantes implicaciones en la respuesta inmunológica o el receptor KILLER/DR5 (Wu et al., 1997). Aunque ninguno parece esencial para la apoptosis mediada por p53, si podrían ejercer un papel sensibilizando a la célula frente a las señales de muerte de sus respectivos ligandos. p53 también es capaz de mediar apoptosis por mecanismos independientes de su función como activador de la transcripción, aunque por mecanismos menos establecidos (Bates and Vousden, 1999). Estos podrían incluir la existencia de dominios funcionales implicados directamente en inducción de apoptosis como la región rica en residuos de prolina entre los aminoácidos 60-97 (Sakamuro et al., 1997), la interacción directa con proteínas inductoras de apoptosis como BAX (Chipuk et al., 2004), la transrepresión e inhibición de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 o BclXI o un papel directo en la mitocondria, ya que, en células tumorales, una porción de p53 se localiza en ciertos casos en la mitocondria (Mihara et al., 2003).

La decisión de la célula entre sufrir parada de ciclo celular o entrar en un proceso de apoptosis, ambos procesos regulados por p53, dependerá de multitud de condiciones externas e internas como el tipo celular, la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la composición oncogénica de la célula, los estímulos extracelulares y la intensidad de las condiciones de estrés, los factores de supervivencia y crecimiento presentes o los niveles de expresión de p53 y de las interacciones de las proteínas reguladoras de su actividad (Sionov and Haupt, 1999; Slee et al., 2004). Por ejemplo, las proteínas ASPP promueven la función transactivadora de p53 dirigiendo específicamente hacia la transactivación de genes proapoptóticos (Samuels-Lev et al., 2001).

5.2.3. Otras funciones de p53

p53 esta también implicado en la parada irreversible del ciclo celular en G1 llamada senescencia celular que ocurre en las células primarias en cultivo (Bond et al., 1996; Lundberg et al., 2000; Shay and Roninson, 2004; Webley et al., 2000).

También p53 juega un papel directo en el mantenimiento de la estabilidad genética, participando directamente en los mecanismos de reparación del ADN tanto tras daño provocado por radiación o cualquier otro elemento extraño, como en el mantenimiento normal durante fenómenos como la recombinación homóloga (Albrechtsen et al., 1999).

También se le ha atribuido funciones en la inhibición de la angiogénesis y metástasis (Nishimori et al., 1997; Sun et al., 2004).

5.3. Regulación de la actividad de p53. Estabilidad proteica

La proteína p53 se expresa normalmente de forma constitutiva pero se encuentra en muy bajos niveles dentro de la célula debido a su rápida degradación, lo que hace que tenga una vida media muy corta (Kubbutat and Vousden, 1998). Aunque se han descrito posibles papeles para p53 en estado inactivo latente (Albrechtsen et al., 1999), normalmente se necesita su activación tras un estímulo o estrés celular para que ejerza sus funciones. Tras su activación la proteína aumenta su estabilidad, se acumula y se redirige hacia el núcleo celular donde puede desarrollar su función como factor de transcripción. La regulación de la activación de p53 debe estar fuertemente controlada, puesto que los efectos de esta para la célula pueden ser catastróficos en las condiciones inadecuadas.

Principalmente esta activación consiste, en primera instancia, en un aumento de la estabilidad de la proteína conseguido a través de modificaciones postraduccionales que la hacen menos susceptible a la degradación.

p53 es marcada para su degradación por el proteosoma mediante poliubiquitinación, un proceso mediante el cual un sistema de enzimas añade cadenas de varias ubiquitinas a residuos de lisina en la proteína diana. La proteína p53 se poliubiquitina en varias lisinas de su extremo carboxilo terminal, siendo marcada de este modo para su posterior degradación en el proteosoma (Kubbutat et al., 1997).

La proteína Mdm2, principal regulador negativo de p53, funciona como una enzima E3 ubiquitina ligasa para p53. Mdm2 interacciona con p53 a través de su dominio de transactivación N-terminal inhibiendo la actividad transcripcional de p53 previniendo su interacción con la maquinaria transcripcional y promoviendo a la vez su degradación. Mdm2 es capaz de ubiquitinar a p53 en su extremo carboxilo terminal, aunque se ha propuesto que en ciertos casos sólo es capaz de multiubiquitarlo (añadir varios monómeros de ubiquitina) y no poliubiquitarlo, como es necesario para marcar la proteína para su degradación (Lai et al., 2001). Recientemente se ha descubierto la actividad ubiquitina ligasa del coactivador p300, que se ha mostrado como capaz de poliubiquitinar a p53, en conjunción con Mdm2, promoviendo su degradación (Grossman et al., 2003; Grossman et al., 1998). Recientes datos apuntan también a un modelo en el que el p53 monoubiquitinado tendría funciones propias, promoviendo la exportación de p53 del núcleo y redirigiendo así la actividad de p53 hacia la mitocondria (Li et al., 2003; Michael and Oren, 2003). El descubrimiento de la proteína proteasa específica de ubiquitina asociada a herpes virus HAUSP, un antagonista directo de Mdm2 que actúa quitando ubiquitinas de p53 tras activación por daño al ADN, a puesto de manifiesto la importancia también de la desubiquitinación para la regulación de la activación de p53 (Li et al., 2002).

La región de interacción de p53 con Mdm2 comprende los residuos 1 al 41, con una región mínima de interacción entre los aminoácidos 18 y 23 (PickSley et al., 1994) entre los que se encuentran varias serinas y treoninas susceptibles de fosforilación, como se discutirá más adelante. Varios mecanismos de estabilización de p53 promueven la interrupción de la interacción entre p53 y

Mdm2 impidiendo así su degradación y permitiendo su acción transactivadora (Chène, 2003; Vousden, 2002). En ausencia de unión directa, también se ha detectado la regulación negativa de p53 por Mdm2 ubiquitinándolo y promoviendo su salida del núcleo y degradación (Inoue et al., 2001). El homólogo de Mdm2, Mdm4, más conocido por MdmX, también podría tener un papel regulador negativo sobre p53 aunque no promueve su degradación (Michael and Oren, 2002; Parant et al., 2001) y cuando es sobre-expresado provoca la estabilización de p53 por un mecanismo en el que podría estar involucrada la degradación o la supresión de la función de Mdm2 (Mancini et al., 2004; Stad et al., 2001).

El gen Mdm2 es a su vez diana transcripcional para p53, de modo que se establece un bucle regulador entre p53 y Mdm2 de forma que la activación de p53 induce la expresión de su propio regulador negativo asegurando así una activación transitoria de p53 (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995; Wu et al., 1993). Mdm2 también puede autoubiquitinarse promoviendo su propia degradación, regulando su propia estabilidad (Buschmann et al., 2000; Stommel and Wahl, 2004). Del mismo modo, es extensamente fosforilado por distintas quinasas para regular su función (Hay and Meek, 2000; Maya et al., 2001).

La habilidad de Mdm2 de traslocar junto con él a p53 del núcleo al citoplasma parece ser importante también para la degradación efectiva de p53. p53 posee varias señales de localización nuclear en el extremo carboxilo terminal que contribuyen a su localización en el núcleo (Vousden and Vande Woude, 2000) y también señales de exportación del núcleo (una en el extremo carboxilo terminal y otra en la región de unión a Mdm2) regulan su vuelta al citoplasma. Este mecanismo de localización también está implicado en el control de la función de p53. Parece ser que en la salida de p53 del núcleo está implicada la actividad ubiquitina ligasa de Mdm2, aunque esta no es absolutamente necesaria (Zhang and Xiong, 2001). Principalmente es aceptado que la salida de p53 del núcleo contribuye a su degradación (Boyd et al., 2000; Geyer et al., 2000), aunque hay datos que apuntan a que la degradación de p53 promovida por

Mdm2 puede ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que ambas proteínas co-localicen (Lohrum et al., 2001; Stommel and Wahl, 2004; Xirodimas et al., 2001). Como se ha apuntado antes, la monoubiquitinación de p53 por Mdm2 podría jugar un papel en la localización de p53 redirigiendo su actividad hacia el citoplasma y pudiendo ser degradado tanto en este como en el núcleo (Li et al., 2003; Michael and Oren, 2003).

La proteína oncogénica p14^{ARF} también estabiliza y activa a p53 en respuesta a señales mitogénica inapropiadas u oncogenes activados, por medio de su interacción con Mdm2 (Lloyd, 2000; Sherr and Weber, 2000). ARF secuestra a Mdm2 bien en el nucleolo, donde se localiza, o bien en cuerpos nucleares en el nucleoplasma impidiendo su acción sobre p53 (Sherr and Weber, 2000).

Existen mecanismos reguladores de la estabilidad de p53 independientes de Mdm2 entre los que se incluyen ubiquitinación por la proteína E6 codificada por algunos papiloma virus (Talis et al., 1998), degradación directa por JNK (Fuchs et al., 1998), degradación por la proteasa calpaína en algunos sistemas (Kubbutat and Vousden, 1997) o activación por β -catenina (Damalas et al., 1999). Otras enzimas también interaccionan y funcionan como E3-ubiquitina ligasas para p53. Es el caso de COP1 (Dornan et al., 2004) y Pirh2 (Leng et al., 2003), genes diana de p53 que inducen su degradación en un proceso independiente de Mdm2 y que también establecen un bucle regulador negativo similar al de este. Todas estas proteínas son capaces de estabilizar p53 en líneas nulas para Mdm2.

5.4. Modificaciones postraduccionales en p53

La estabilización de la proteína que lleva a su acumulación, la activación de su capacidad de unión a secuencias específicas de ADN, y la activación de su dominio de transactivación que le permite interaccionar con la maquinaria basal de transcripción son los tres eventos principales en la respuesta de p53. Todos

ellos están regulados por modificaciones postraduccionales en múltiples aminoácidos. Para que p53 se active y realice su función de manera rápida y transitoria, su actividad esta fuertemente regulada mediante multitud de modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación, ubiquitinación, acetilación, ribosilación, sumoilación y glicosilación. Estas modificaciones se interrelacionan con frecuencia para regular la función y actividad de p53 (Brooks and Gu, 2003) (Fig. 8).

La proteína poli ADP-ribosa polimerasa PARP ribosila a p53 en sitios dentro de la región central y dominio carboxilo terminal en respuesta a radiación ionizante aumentando su estabilidad (Vaziri et al., 1997; Wesierska-Gadek et al., 1999). También en el carboxilo terminal se produce la sumoilación del residuo Lys386 en respuesta a daño en el ADN (Appella and Anderson, 2001; Melchior and Hengst, 2002) y la glicosilación, que afecta a la unión al ADN (Shaw et al., 1996).

En respuesta a daño al ADN por radiación ultravioleta o ionizante, los coactivadores de la transcripción p300 y pCAF acetilan las lisinas 373 y 382 entre otros residuos del dominio carboxilo terminal de p53 incrementando la unión a secuencias específicas de ADN (Liu et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998; Wang et al., 2003). Para ello p300 se une a secuencias específicas en el dominio amino de p53, compitiendo con Mdm2 (Dornan et al., 2003b; Ito et al., 2001). Modificaciones postraduccionales en ese dominio tienen efectos contrarios para la unión de Mdm2 y de p300, impidiendo la primera y favoreciendo esta ultima, teniendo como resultado un aumento de la estabilidad de p53 y un aumento de su actividad transcripcional (Dornan and Hupp, 2001; Yuan et al., 1999). Se ha descrito también un posible papel de la acetilación de Mdm2 por CBP en la inhibición de la degradación de p53 por su regulador negativo (Wang et al., 2004). Un importante papel en regulación de la transcripción mediada por p53 lo tiene la deacetilación por enzimas deacetilasas de histonas como Sir2 α (SIRT1), capaz de deacetilar a p53 y atenuar su actividad transcripcional (Luo et al., 2001).

La modificación postraducciona l más estudiada y extendida es sin duda la fosforilación. Se han descrito varios residuos fosforilados *in vivo* y/o *in vitro* localizados en el dominio amino terminal o en el carboxilo terminal. El papel de estas fosforilaciones en la activación de p53 ha sido muy discutido (Ashcroft et al., 1999; Blattner et al., 1999; Meek, 1999), pero hoy se acepta que la fosforilación de al menos ciertos residuos juega un papel importante *in vivo* en la estabilización y activación transcripcional de la proteína tras distintos estreses como daño la ADN provocado por radiación ionizante o ultravioleta, agentes que actúan sobre los microtúbulos como taxol y nocodazol o actinomicina D, entre otros.

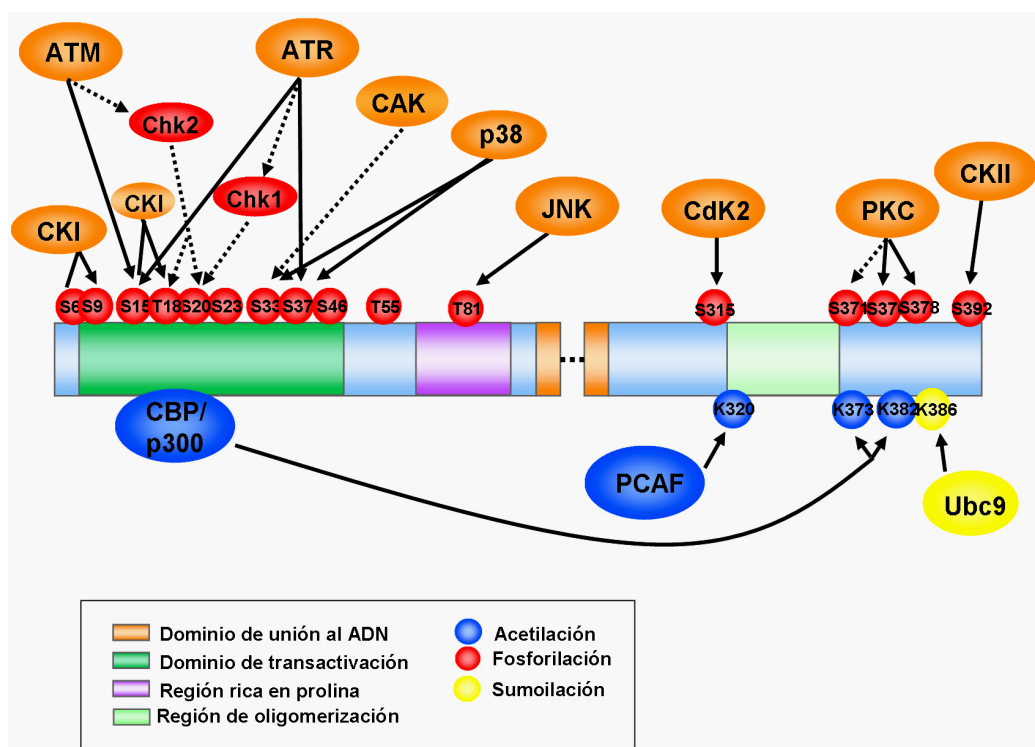


Figura 8. Principales dianas de modificaciones postraducciona les en p53 y enzimas responsables en la literatura. La línea punteada indica una pobre verificación experimental *in vivo*.

También se han encontrado diferencias sustanciales en el patrón y estado de

fosforilación de p53 en tumores y líneas tumorales frente a las células no transformadas (Minamoto et al., 2001). Más aun, el patrón de fosforilación de p53 cambia también según el tipo de estrés al que estén sometidas las células, proporcionando un posible mecanismo selectivo de activación de la función de p53 (Webley et al., 2000). p53 se fosforila al menos en el dominio amino terminal en las serinas 6, 9, 15, 20, 33, 37 y 46 y las treoninas 18, 55 y 81, y en la región carboxilo terminal en las serinas 315, 371, 376, 378 y 392. La proteína murina se fosforila además en otros sitios adicionales como las treoninas 73 y 83 por MAPK (Meek, 1998).

La fosforilación y acetilación en el dominio carboxilo terminal estimula la unión al ADN de p53 (Gu and Roeder, 1997; Hupp et al., 1995). Fosforilaciones por parte de CKII en serina 392 y la quinasa dependiente de ciclina B, p34(Cdc2), en serina 315 tienen esta función (Appella and Anderson, 2001; Meek, 1998). De la misma forma, a modificaciones en esta región también se las han involucrado en regulación de la degradación de p53 (Kubbutat et al., 1998). En este último caso la fosforilación de la serina 378 por PKC estimula la degradación de p53 en células sin estrés y serina 376, otro sitio fosforilado por PKC, parece ser desfosforilado en respuesta a radiación ionizante (Chernov et al., 2001; Waterman et al., 1998).

En el dominio amino terminal, todas las serinas y treoninas dentro de los primeros 89 aminoácidos pueden ser fosforiladas o defosforiladas en respuesta a distintas condiciones de estrés (Appella and Anderson, 2001) (Fig. 8). Por ejemplo la quinasa activada por quinasa dependiente de ciclina CAK fosforila a la serina 33 al menos *in vitro*, residuo que es fosforilado tempranamente en respuesta a radiación ionizante y ultravioleta. La serinas 37 y 46 son fosforiladas preferentemente tras radiación ultravioleta, así como la treonina 81. ATR ha sido implicada en la fosforilación del residuo 37 y p38 en el 46 además del 33, mientras que JNK fosforila la treonina 81.

La interrupción de la interacción entre p53 y Mdm2 juega un papel primordial en la estabilización y acumulación de p53. Modificaciones

postraduccionales en las regiones de p53 y Mdm2 responsables de esta interacción tienen un importante papel en su regulación. Son varios los residuos fosforilados en esa zona en respuesta a estrés. La fosforilación en serina 15 se induce de manera muy rápida y transitoria en respuesta a radiación ionizante y de una manera más lenta y prolongada tras tratamiento con radiación ultravioleta además de ante varios agentes como cis-platino o DFX (que mimetiza hipoxia), pero no con actinomicina D (Ashcroft et al., 2000). Tanto la quinasa ATM como ATR han sido implicadas en esta fosforilación en respuesta respectivamente a radiación ionizante o ultravioleta. La mutación de serina 15 reduce la acumulación de p53 tras daño en el ADN (Chao et al., 2000) y aunque inicialmente se describió la interrupción de la interacción entre p53 y Mdm2 por medio de la fosforilación de este residuo (Shieh et al., 1997), finalmente se ha mostrado que la modificación de este residuo no es suficiente para promover ese efecto (Dumaz and Meek, 1999). En realidad los únicos residuos fosforilables dentro de la región mínima de interacción entre p53 y Mdm2 (aminoácidos 18-23) son la treonina 18 y la serina 20. Los residuos 19 a 25 de p53 forman una α -hélice anfipática que interacciona directamente con el bolsillo hidrofóbico que se forma entre los residuos 1 al 41 en Mdm2 (Fig. 9).

Los aminoácidos triptófano 23, fenilalanina 19 y leucina 22 son esenciales para el mantenimiento de la estructura en p53 y el puente de hidrógeno que se forma entre los aminoácidos treonina 18 y asparagina 21 es también esencial para la formación de esa α -hélice (Jabbur et al., 2002; Kussie et al., 1996; Schon et al., 2002). Los resultados experimentales indican que la fosforilación de p53 en serina 20 tiene un papel en la regulación negativa de p53 por Mdm2 (Chehab et al., 1999; Hirao et al., 2000; Unger et al., 1999), pero el efecto ha de ser indirecto, puesto que no se hay evidencia de interrupción de esa interacción por modificaciones en este residuo (Craig et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000). Serina 20 es fosforilada en respuesta a daño al ADN por Chk2 y Chk1, quinasas que actúan tras su activación por ATM y ATR respectivamente, aunque el papel de estas quinasas en la activación de p53 por daño a ADN ha sido discutido

recientemente (Ahn et al., 2003; Wu et al., 2002). La fosforilación de este residuo también ha sido implicada en promover la unión entre p53 y el coactivador p300, promoviendo la acetilación del carboxilo terminal de p53 y finalmente su actividad transcripcional (Dornan and Hupp, 2001).

En cuanto a la treonina 18, es el único residuo que parece estar involucrado en el mantenimiento de la interacción entre p53 y Mdm2 (Bottger et al., 1999; Jabbur et al., 2002; Sakaguchi et al., 2000; Schon et al., 2002). Según datos estructurales, también podría tener el mismo efecto sobre la interacción entre Mdm2 y el homólogo de p53, p73 (Schon et al., 2002). Del mismo modo que en la serina 20, su fosforilación se ha mostrado capaz al mismo tiempo de estabilizar la unión entre p300 y p53 (Dornan and Hupp, 2001).

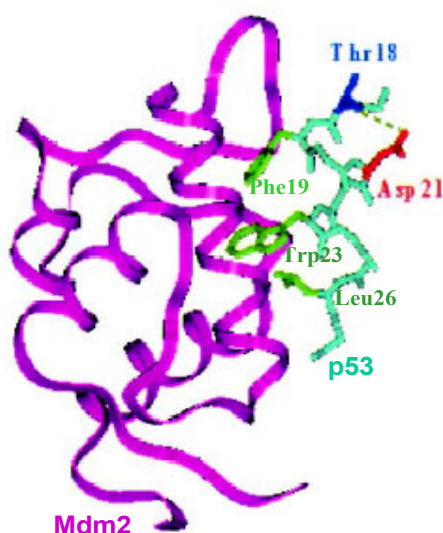


Figura 9. Interacción p53-Mdm2. Representación esquemática de la α -hélice de p53 que interacciona con el bolsillo hidrofóbico en Mdm2. Se muestran los residuos de p53 esenciales para la interacción. Adaptado de (Jabbur et al., 2002).

Modificaciones en este residuo se han encontrado en respuesta a daño al ADN, en cánceres de mama que expresan p53 silvestre y en células que sufren senescencia replicativa (Craig et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000; Webley et al., 2000). La quinasa responsable de esa fosforilación no está del todo caracterizada. Se ha descrito fosforilación en treonina 18 por parte de CK1- δ , previa fosforilación del residuo serina 15 (Dumaz et al., 1999; Sakaguchi et al.,

2000), propiedad enzimática propia de las caseína quinasas (Flotow et al., 1990). También se ha descrito su fosforilación por parte de la quinasa Chk2 (Craig et al., 2003). p53 también es fosforilada, al menos *in vitro*, por VRK1 sin requerir ninguna otra fosforilación previa (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Aunque tanto la fosforilación en treonina 18 como en serina 20 pueden influenciar la asociación de Mdm2 con p53 *in vitro*, construcciones de p53 completa mutadas en estos residuos son susceptibles de estabilización en respuesta a estrés en células transfectadas (Ashcroft et al., 1999; Blattner et al., 1999).

Es previsible que fosfatasas específicas regulen la defosforilación de estos residuos en p53 para volver a su estado inicial latente y asegurar que la activación sea transitoria. Se conoce la existencia de algunas de ellas, como por ejemplo la fosfatasa Wip1 (Takekawa et al., 2000) o la Cdc14 humana (Li et al., 2000).

Eventos de fosforilación específicos pueden depender de otras modificaciones postraduccionales previas (Saito et al., 2003). Además para la activación de una respuesta completa de p53 se requieren normalmente la integración de varias señales que conducen a diversas modificaciones en la proteína. Se ha postulado que el perfil de fosforilación y otras modificaciones podría ser un mecanismo para añadir selectividad a la respuesta mediada por p53 (Brooks and Gu, 2003). Diversos estreses activan distintas vías de señalización que pueden cooperar para conseguir una máxima y específica activación de p53.

5.5. p53 y cáncer

La proteína p53 se encuentra inactivada en aproximadamente el 50% de los tumores (Hollstein et al., 1994). Esta inactivación ocurre mediante diversos mecanismos como defectos en las rutas de activación de p53 y mutaciones en el gen del propio supresor de tumores o de sus dianas. Muchas de las estrategias en desarrollo para abordar el tratamiento del cáncer van encaminadas a restaurar

la función de p53 en estos tumores, ya que las células tumorales tienen una mayor sensibilidad a apoptosis (Evan and Vousden, 2001). Se hacen esfuerzos para dilucidar los mecanismos responsables de la regulación independiente de las funciones apoptóticas y de parada de ciclo en p53, para poder activar específicamente la muerte de las células afectadas (Blagosklonny, 2004).

Las estrategias van desde terapia génica para expresar el supresor de tumores funcional y desencadenar una muerte por apoptosis o una parada de ciclo al tratamiento con péptidos que restauran la función de p53 mutado (Vousden and Lu, 2002). En tumores con p53 silvestre no alterado, normalmente hay una desregulación de algún otro elemento, con frecuencia un regulador, en último término, de la función de p53, como ocurre por ejemplo en un alto porcentaje de los tumores de mama. En estos casos los cada vez mayores conocimientos moleculares de las rutas que llevan a la activación de p53 permiten intentar actuar corrigiendo la alteración concreta. Especial atención está teniendo el desarrollo de péptidos o moléculas que actúan impidiendo la interacción entre Mdm2 y p53, promoviendo su estabilización (Chène, 2003; Vassilev et al., 2004), sobre todo en tumores con una sobre-expresión de Mdm2.

La inhibición y regulación de la actividad de quinasas implicadas en la activación de p53 y en general en la respuesta a daño en el ADN y el control del ciclo celular, tiene importantes aplicaciones en clínica. Los agentes que dañan el ADN se encuentran entre los anticancerígenos más usados y potentes pero tienen importantes limitaciones que podrían ser minimizadas manipulando a las proteínas que intervienen en esta regulación (Zhou and Bartek, 2004).

Los nuevos conocimientos sobre los cofactores requeridos para las funciones de p53 permiten la aparición de potenciales nuevas dianas terapéuticas.

OBJETIVOS

- **Caracterizar funcionalmente a la quinasa VRK1.**
- **Establecer y caracterizar la relación entre VRK1 y p53.**
- **Investigar las funciones fisiológicas de VRK1 en la célula así como su posible papel en procesos tumorales.**

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y
MÉTODOS

1. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST

La cepa BL21DE3 de *Escherichia coli* se transformó con los vectores indicados para expresión de proteína recombinante unida a GST. Se inoculó dicha cepa en medio selectivo (LB + ampicilina 50µg/ml) y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche. Se diluyó ese inóculo en medio selectivo fresco y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.6-0.8. En este punto se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG a 0.2mM y dejando crecer a 30°C durante 3 a 4 horas más. El cultivo bacteriano resultante se centrifugó a 10000 x g y el “pellet” resultante fue resuspendido en tampón de lisis (PBS frío + 1% Tritón X-100, 0.2 µg/ml Lisozima, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml leupeptina). Tras 20 min de incubación, se sonicó la suspensión con 2 pulsos de 30 s cada uno a 4°C y baja potencia y se centrifugó a 30000 x g 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante contiene las proteínas solubles, entre las que se encontraba de forma mayoritaria la proteína de fusión expresada. Esta fracción soluble se incubó con resina de Sefarosa-glutación (“*Glutathion Sepharose 4B beds*”, Amersham Pharmacia Biotech) por 3 h a 4°C en agitación suave. Después de este tiempo se lavó la resina varias veces mediante centrifugación suave con PBS + inhibidores de proteasas y se eluyó la proteína por varias veces con 20mM de glutatión reducido en 50mM de Tris-HCl pH 8 por 15 min a temperatura ambiente y en agitación suave. Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie o “Western blot”. Una vez comprobada, se dializó el eluido mediante membrana de diálisis frente a tampón de diálisis (25mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl y 5% glicerol) o PBS + 5% Glicerol y se concentró en centrífuga “Amicon Ultra” (Millipore) antes de cuantificarla usando el kit “BIORAD protein assay” (Biorad).

2. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a epítipo 6xHis

Esencialmente el protocolo seguido fue el mismo que para expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST salvo que se añadió al tampón de lisis así como a los lavados 10mM de imidazol. La resina usada en este caso fue “*Talon metal affinity resin*” (Clontech) y el método de elución fue en PBS con imidazol en concentraciones crecientes desde 50mM y hasta 500mM. Tras su comprobación mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie se unieron todos los eluidos que contenían pura la proteína en cuestión y se dializaron, concentraron y cuantificaron de la misma forma.

3. Ensayos quinasa de VRK1

Los ensayos quinasa se realizaron en un volumen final de 25 µl de tampón quinasa (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT y 5 µM ATP-Mg²⁺) con 1 a 2 µg de la proteína recombinante VRK1 correspondiente y distintas cantidades de proteína sustrato según el caso. A la mezcla de reacción anterior se añadió 5 µCi de [γ ³²P]ATP y se incubó por 0.5-1 h a 30°C.

Las proteínas fosforiladas, salvo indicación de lo contrario, se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%/0.1% SDS. El gel fue posteriormente teñido y desteñido con tinción de *Coomassie* para detectar todas las proteínas y secado en un secador de geles (*Biorad*) por 2 horas a 80°C. La radiactividad incorporada se analizó usando el sistema de detección “*FX molecular imager system*” (*Biorad*) y el programa “*Image Quant*” de la misma compañía.

4. Tinción con azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida se tiñeron en solución de *Coomassie* (0.5% azul de *Coomassie*, 50% metanol, 10% ácido acético) durante 10 min en agitación y se destiñeron posteriormente en solución de distinción (50% metanol, 10% acético) en agitación hasta la correcta visualización de las bandas de interés.

5. Generación de vectores de ADN recombinantes

Las construcciones de ADN usadas son descritas en la **Tabla 1**. Las construcciones diseñadas en el laboratorio se generaron insertando secuencias de ADNc codificantes en los correspondientes vectores mediante reacciones de digestión de fragmentos con enzimas de restricción (*Promega*) y posterior ligación con la enzima “*T4 ADN-Ligasa*” (*Promega*) según (Sambrook and Russell, 2001). Las construcciones así obtenidas se transformaron en la cepa bacteriana competente más adecuada en cada caso seleccionando las colonias transformantes con la resistencia específica para cada vector.

6. Mutagénesis dirigida

Para la inserción de mutaciones puntuales en construcciones de ADN se utilizó el sistema comercial “*QuickChange Site-Direct Mutagenesis*” de la compañía *Stratagene*. Para ello se utilizó un vector de ADN de doble cadena con el inserto de interés y dos oligonucleótidos sintéticos, complementarios de ambas cadenas del vector, conteniendo la mutación deseada. Tras una reacción de PCR con la polimerasa de ADN *PfuTurbo* se obtienen plásmidos mutantes con la nueva sustitución junto con copias parentales. Estas últimas son eliminadas tras tratar con la endonucleasa DpnI, con acción específica sobre secuencias metiladas y hemimetiladas, resultando así seleccionadas las copias mutantes. El producto de PCR así tratado se transformó en cepas bacterianas

DH5 α competentes seleccionando las colonias transformantes con la resistencia específica para cada vector. Las mutaciones así obtenidas se muestran en la **Tabla 2**.

7. Cultivo celular

Las líneas celulares usadas se cultivaron en incubador a 37°C y con una atmósfera al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los medios de cultivo fueron suplementados en todo caso con 2mM de glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomicina. Todas las líneas celulares usadas crecen adheridas a sustrato.

Todos los medios, sueros y suplementos fueron obtenidos de *GIBCO-Life Technologies*.

Una descripción de las líneas celulares usadas se puede ver en la **Tabla 3**.

8. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo

Para las transfecciones de ADN se sembraron las células en cultivo 24 h antes de la transfección a una densidad de modo que estuvieran entre un 60-80% de confluencia en el momento de la transfección. Las células se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas en cada experimento con uno de los siguientes métodos:

- Precipitación con fosfato cálcico según (Seelos, 1997) incluyendo un choque con glicerol al 10% durante 1 min a las 12 horas, antes de retirar los precipitados, para aumentar la eficiencia de transfección. Se usó principalmente este método con las líneas celulares H1299 y 293T.
- Usando “*JetPEI Cationic polymer transfection reagent*” (*Polytransfection*) según las instrucciones del fabricante a una N/P *ratio* (número de residuos de nitrógeno del reactivo por fosfato del ADN) de 5. Usamos este reactivo con líneas celulares con baja eficiencia de transfección con el método de precipitación con fosfato cálcico, como en la MCF-7 o en MEFs.
- Usando “*Lipofectamine 2000*” (*Invitrogene*) según las instrucciones del fabricante y a una *ratio* ADN:Lipofectamine de 1:3. Se usó este método cuando una eficiencia de transfección particularmente alta era deseada y en todo caso con la línea celular A549.

Como control de la eficiencia de transfección, fue introducido en todo caso un vector para expresión eucariota constitutiva de la proteína fluorescente verde GFP en cantidad y condiciones iguales a las de las construcciones transfectadas

para el experimento. Tras la transfección, la expresión génica fue analizada entre las 24 y 48 h, según el caso.

9. Electroforesis SDS-PAGE y “Western blot”

Para la obtención de extractos proteicos totales de células en cultivo, las células se lavaron con PBS frío y se recogieron en tampón de lisis Tritón X-100 (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 5mM EDTA) más inhibidores (1mM PMSF, 10µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 5µg/ml pepstatina A, 1mM ortovanadato de sodio y 1mM fluoruro sódico) añadidos en el momento. Tras incubación de 30 min en hielo se centrifugaron los extractos por 20 min a 16.000 x g a 4°C. Se recuperó la fracción soluble y se midió la cantidad proteica total con “BIORAD protein assay” (Biorad) y BSA como patrón.

Una cantidad igual de extracto de proteínas se resolvió mediante electroforesis vertical en gel SDS-PAGE, con distinto porcentaje de acrilamida según el tamaño de la proteína a analizar. Para ello se corrió el gel en condiciones desnaturalizantes añadiéndole a las muestras tampón de carga (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10mM DTT) y corriendo el gel en tampón de carrera (25mM Tris, 192mM glicina y 1.7mM SDS) según (Laemmli, 1970).

Las proteínas se transfirieron después a una membrana PVDF (Millipore) mediante transferencia húmeda en el tampón de transferencia según (Towbin et al., 1979) (25 mM Tris, 19.2mM glicina y 20% metanol).

Se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana durante 1-2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación en 5% de leche en el tampón TBS-T (25mM Tris, 50mM NaCl, 2.5mM KCl y 0.1% Tween-20).

Para “Western blot”, salvo indicación de lo contrario, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario a la dilución adecuada por 1-2 h a temperatura ambiente, seguido de varios lavados de TBS-T en agitación durante 30 min. El anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa se incubó con la membrana a la dilución adecuada durante 0.5-1 h a temperatura ambiente. En algunos casos se utilizó un puente de biotina para mejorar la detección. Para ello la membrana se incubó tras el primario con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con biotina y seguidamente con Streptavidina-Peroxidasa. La membrana se lavo varias veces en agitación durante 30 min al menos antes de detectar la luminiscencia tras incubación con el reactivo ECL (Amersham). La luminiscencia emitida se detectó en exposición de película de rayos X.

Los principales anticuerpos usados en los experimentos se pueden ver listados en la **Tabla 4**.

10. Inmunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo a partir de 1-1.5 mg de extracto proteico total. Se pre-incubo este extracto con 30µl de sefarosa

“Gamma-Bind Plus” (Amersham) por 30 min a 4°C con rotación para eliminar uniones inespecíficas. El extracto así pre-clareado se incubó con el anticuerpo concreto a la concentración adecuada por 2-3 h a 4°C con rotación y a continuación se añadieron 50µl de “Gamma-Bind Plus” sefarosa (Amersham) pre-bloqueadas con seroalbúmina bovina al 1%. Se incubó esta mezcla por 1 a 2 horas más a 4°C con rotación. Tras este tiempo se recogieron las bolas de sefarosa por centrifugación suave y se lavaron con el tampón de lisis por varias veces y con Tris 50mM pH7 antes de añadirles tampón de muestra y analizar las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo mediante electroforesis SDS-PAGE y “Western blot”.

11. Inmunofluorescencias

Para la detección y localización de proteínas expresadas en células en cultivo las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio estériles y se trataron en la forma correspondiente para cada caso. Las células fueron lavadas con tampón PBS frío y fijadas con para-formaldehído al 4% en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células fueron permeabilizadas en PBS frío con 0.2% de Tritón X-100 por 30 min y después tratadas con glicina 10mM por 10 min a temperatura ambiente. Tras la permeabilización, se bloquearon con 1% seroalbúmina bovina en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron por 30 min a 37°C o 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo frente al antígeno en cuestión en la misma solución. Tras lavar las células tres veces con 0.1% Tritón X-100 en PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario específico para cada primario marcado con un fluorocromo fluorescente. Tras otros 3 lavados en el mismo tampón, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) por 10 min en PBS a temperatura ambiente. Tras un último lavado con PBS los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con *Gelvatol* (Monsanto) y la localización subcelular de los antígenos se analizó mediante microscopía.

12. Medida de la actividad transcripcional con gen reportero de Luciferasa

La actividad transcripcional de p53 se determinó usando diferentes construcciones con elementos de respuesta a p53, bien sintéticos o bien específicos de algunos de los genes que son transactivados naturalmente por él, acopladas al gen de la luciferasa de luciérnaga.

Las células de la línea celular H1299 se sembraron a 5×10^5 células por pocillo en placa de 6 pocillos (35mm de diámetro). 24 h después se transfectaron mediante el reactivo *JetPEI* (Polytransfection) con 0.5µg de la construcción reportera específica, 0.2µg de p53 y 2µg o igual cantidad de vector vacío. Como control interno se usó el plásmido pRL-tk (0.3µg), que codifica para la luciferasa de *Renilla* para la normalización. Se midió la actividad luciferasa entre 20 a 36 h

tras la transfección usando el sistema “*Dual Luciferase reporter*” de *Promega* y determinando la luminiscencia emitida con un luminómetro “*MiniLumat LB9506*” (*Berthold*).

Con las líneas celulares silvestres para p53 se operó de la misma forma pero sin transfectar con la construcción codificante para p53.

13. Análisis mediante citometría de flujo (FACS)

Para analizar la expresión de VRK1 en las distintas fases del ciclo celular se realizó un análisis simultáneo del contenido de ADN y de proteína mediante el doble marcaje con ioduro de propidio y anticuerpos específicos marcados con un fluorocromo.

Se recogieron las células creciendo en placas de cultivo mediante tripsinización (tripsina-EDTA 5 min a 37°C) y centrifugado posterior por 5 min a 300 x g y temperatura ambiente. Tras un lavado con medio, las células se resuspendieron a una densidad de unas 10^6 células por ml y se fijaron transfiriéndolas a un tubo con 15 ml de 80% etanol, manteniéndose de 4 h a varios días a 4°C. Tras la fijación las células se lavaron con PBS y se resuspendieron posteriormente en la solución de permeabilización (0.25% v/v de Tritón X-100 en PBS, pH 7.4 a 4°C) manteniéndolas así por 5 min a 4°C. Tras un nuevo lavado, se resuspendieron en 100 µl de 1% BSA en PBS pH 7.4 con la dilución apropiada de anticuerpo (unos 0.5 µg por muestra) anti-VRK1 policlonal y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Tras esta incubación se lavaron las células con 5 ml de PBS más 1% BSA y se resuspendieron en 100 µl del secundario adecuado marcado fluorescentemente (IgG anti-conejo marcado con Cy2, en este caso) a una dilución de 1:30. Se incubaron por 30 min más a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Para teñir con ioduro de propidio se lavaron las células con 5 ml de PBS más 1% BSA y, tras centrifugar, se resuspendieron en la solución de tinción con ioduro de propidio (5 µg/ml de ioduro de propidio y 200 µg/ml de RNasa A en PBS, pH 7.4, preparada fresca) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células así marcadas se analizaron en un citómetro “*FACScalibur*” (*Beckton-Dickinson*) midiendo la fluorescencia verde asociada al antígeno y la fluorescencia roja asociada al ADN del ioduro de propidio.

Para analizar el perfil de ciclo de células con VRK1 sobre-expresada, se transfectaron estas con un vector de expresión para VRK1 y trazas de vector de expresión con GFP como marcador. De 48 a 60 h tras la transfección se fijaron las células como se describe anteriormente y se marcaron con ioduro de propidio. En el citómetro se analizó el perfil de ciclo de células seleccionadas como positivas para GFP (transfectadas).

14. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN celular total se extrajo mediante el uso de membranas basadas en sílica-gel de la casa comercial *Qiagen* (“*RNAeasy kit*”). El ARN así obtenido se

analizó y cuantificó usando un “*Bioanalyzer 2100 nano-lab chip*” de *Agilent technologies*. Se usaron 100 ng de ARN total en una reacción de RT-PCR a tiempo real usando el kit “*Quantitec SYBR Green RT-PCR kit*” de *Quiagen* en un termo-ciclador “*iCycler*” (*Biorad*) y los oligonucleótidos sonda específicos en cada caso. La reacción se analizó con el software de “*iCycler*” y los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio.

15. Ensayo de unión entre *mdm2* y proteína de fusión GST-p53

La proteína de fusión GST-p53 fue previamente fosforilada por VRK1, usando 2 µg de proteína recombinante VRK1 y 1-2 µg de GST-p53 como sustrato por 3 h con 0.5mM de ATP-Mg²⁺ en tampón quinasa. Tras la fosforilación, la proteína GST-p53 se purificó mediante su unión a resina de Sefarosa-glutación (*Glutathion Sepharose 4B beds, Amersham Pharmacia Biotech*). La proteína Mdm2 se sintetizó en presencia de metionina marcada con S³⁵ usando un sistema de transcripción/traducción *in vitro* (*Promega*). Se incubaron ambas proteínas a 4°C en 200µl del tampón de unión (50mM Tris pH 7.4, 250mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 5mM EDTA, 2mM DTT) por 2 h. Los complejos se lavaron en el mismo tampón, se procesaron con tampón de muestra y se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE. El gel se secó y se expuso en película de rayos X para detectar la marca de S³⁵ correspondiente al Mdm2 unido a p53.

16. Ensayo de focos en NIH/3T3

Se sembraron en placa de cultivo de 100mm de diámetro 1.5 x 10⁵ células de fibroblastos de ratón NIH/3T3 en medio D-MEM más 10% de suero bovino. Al día siguiente se transfectaron por el método de precipitación con fosfato cálcico con el ADN clonado en cuestión, más 20 µg de ADN de alto peso molecular (ADN de esperma de salmón, en este caso) por triplicado. Cuando se trató de verificar la supresión de la formación de focos por proteínas oncogénicas, se usó 1 µg del vector codificante para el mutante activado de la oncoproteína en cuestión (Ras o RhoA). Al siguiente día se retiró el medio con los precipitados de ADN y, tras lavar las placas con medio, se añadió medio fresco con 10% de suero bovino. Se incubaron las placas a 37°C en incubador de CO₂ (5%) cambiándole el medio por medio fresco más 10% de suero bovino 3 veces por semana. Tras 2-3 semanas se observó la aparición de focos transformantes y se tiñeron las células con colorante Giemsa. Para ello las células se lavaron con PBS antes de fijarlas con 10% formaldehído en agua por 5 min. Tras la fijación se lavaron las placas con agua bi-destilada y se tiñeron con una solución de Giemsa preparada fresca mediante dilución 1:10 en agua del producto original (*azul de metileno según Giemsa, Panreac*) y filtrado a través de un filtro estéril de 0.22µm de diámetro de poro. Una vez desarrollado el color, se aspiró la solución colorante y se lavaron las placas con agua bi-destilada varias veces. Secas las placas se contaron los focos visibles mayores de 1,5mm de diámetro en el caso de focos de Ras y 1mm en el de RhoA.

17. Experimentos de supresión de la expresión con RNAi

Los duplex de “SMART selected siRNA” se obtuvieron de “Dharmacon RNA Technologies”. Las secuencias diana para VRK1 (NM_003384) fueron GAAAGAGAGTCCAGAAGTA (duplex siVRK1-1), CAAGGAACCTGGTGTGAA (duplex siVRK1-2), GGAATGGAAAGTAGGATTA (duplex siVRK1-3) y CAAATCTTCTTCTGAACTA (duplex siVRK1-4). Como control negativo se usó el siRNA funcional sin diana humana “siSMART CONTROL” de Dharmacon y como control de la transfección y eficiencia de silenciamiento el siRNA marcado fluorescentemente “siGLO Lamin A/C”. Se transfectaron transitoriamente los siRNA a una concentración entre 100 y 200nM con “Lipofectamine 2000” u “Oligofectamine” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la transfección las células se procesaron para “Western blot”, inmunofluorescencia o video-microscopía tal como se indica.

18. Video-microscopía

Las células se sembraron en placas de 35mm y se transfectaron 24 h después con los siRNA o se trataron como control según se indica. De 30-39 tras la transfección las placas se sellaron con “Parafilm” y se obtuvieron imágenes con contraste de fase secuenciadas cada 5min *in vivo* en un microscopio “Zeiss Axiovert S 100” sobre una placa a 37°C mediante el software Metaview (Chicago) durante al menos 48 h. Las imágenes fueron procesadas luego con el mismo software.

19. Medida de proliferación y viabilidad celular

La proliferación celular se midió con las células adheridas en placas de 96 pocillos 65 h después de la transfección mediante un ensayo colorimétrico usando el “Cell Proliferation Kit II (XTT)” de la compañía Roche y midiendo en un lector de Elisa “Ultraevolution” (Tecan) a la longitud de onda establecida en el protocolo.

20. Amplificación por PCR de ARNs de VRK de ratón

La presencia de los ARN específicos para VRK1, VRK2 y VRK3 se determinó por PCR. Se utilizó como sustrato para la amplificación un décimo de la reacción de transcripción inversa del ARN total extraído. Para la amplificación de VRK1 de ratón (número de acceso de GenBank AA815837) se usaron los oligonucleótidos mVRK1A y mVRK1B, que amplifican una región de 332 nucleótidos. Para la amplificación de VRK2 de ratón (número de acceso de GenBank AA914007) se usaron los oligonucleótidos mVRK2A y mVRK2B, que amplifican una región de 382 nucleótidos. La amplificación se llevo a acabo con un ciclo inicial de 5 min a 95°C seguido de 25 ciclos con los pasos 40 s. a 95°C,

40s. a 56°C y 50s. a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C. Para amplificar la VRK3 de ratón (número de acceso de *GenBank* BC010473) se usaron los oligonucleótidos mVRK3A y mVRK3B, que amplifican una región de 559 nucleótidos. Las condiciones en este caso fueron un ciclo inicial de 5min a 92°C, 30 ciclos con los pasos 40s. a 92°C, 40s. a 58°C y 40s. a 72°C más un ciclo final de 10min a 72°C. Los Oligonucleótidos y condiciones para amplificar β -actina fueron tal como se describen en (Marcos et al., 1997).

Los productos de PCR así obtenidos se analizaron en un gel con 2% de agarosa en tampón TAE. Posteriormente el ADN fue transferido a una membrana “Zeta-Probe” (Biorad) e hibridada con la prueba correspondiente en 5x SSC (0,15M NaCl, 0,015M citrato de sodio), 0.1% SDS, a 65°C por 18 h. Las membranas se lavaron en 2x SSC, 0.1% SDS a 55°C por 15 min seguido por 3 lavados en 0.2x SSC, 0.1% SDS a 62°C por 20 min. La imagen obtenida fue analizada con el programa “Quantity One” usando un analizador de imagen (“FX Image” de Biorad).

21. Reactivos y estimulaciones

Para los experimentos de medida de estabilidad proteica se uso cicloheximida a 50 μ g/ml.

Para provocar activación en la fosforilación de p53 se usó el agente causante de daño en el ADN adriamicina a una concentración de 0,2 μ g/ml por 6 horas o actinomicina D a 5nM. La radiación ultravioleta UV-C a 20J/m² o 50J/m² se aplicó en un “Stratalinker” (Stratagene). La inducción de la expresión de p53 en la línea celular H1299 con el sistema TetOn se llevó a cabo con 2 μ g/ml de tetraciclina por el tiempo indicado.

Cuando se indica, la cafeína se usó a 1mM, la wortmanina a 30 μ M y el inhibidor PD098059 a 30 μ M. El inhibidor del proteosoma MG132 se usa a 25-50 μ M por 4-6 horas. Todos los reactivos obtenidos de la compañía *Sigma* o *Calbiochem*.

22. Inmunohistoquímica de tumores

Se usó un panel de 86 biopsias de tumores de cabeza y cuello en “tissue microarray”. Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron de forma automatizada con un paso de recuperación de antígeno por calor. En ellas se detectó la expresión de VRK1 con el anticuerpo policlonal específico VE1 a dilución 1:1000 y se evaluó y clasificó la expresión de la proteína en valores de 0 (expresión prácticamente nula), 1 (expresión moderada) y 2 (expresión alta).

Tabla 1. Construcciones de ADN recombinante usadas.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
VRK1-pET	pET23a	VRK1 (1196 pb)	BamHI- XhoI	Expresión proteína de fusión con 6xHis en bacterias	
pVRK1- GEX	pGex-4T1	VRK1 (1196 pb)	BamHI - SalI	Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	
pVRK1-pCEFL-HA	pCEFL-HA	VRK1 (1190 pb)	BglII - XbaI	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	
pVRK1-myc	pCDNA 3.1 (-) Myc	VRK1 (1196 pb)	BamHI - KpnI	Expresión eucariota con epítipo myc en carboxilo	
FP 221	pGEX-2T	p53 dominio amino terminal (aa 1-85)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	DW Meek (Dundee, UK)
p53(11-63)GST	pGEX-2T	p53 dominio amino terminal (aa 11-63)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	
p53(90-290)GST	pGEX-2T	p53 dominio central (aa 90-290)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	T. Kouzarides (Cambridge, UK)
p53(290-390)GST	pGEX-2T	p53 dominio carboxilo terminal (aa 290-390)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	T. Kouzarides (Cambridge, UK)
Mdm2(1-188)GST	pGEX-2T	Mdm2 dominio amino terminal (aa 1-188)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	
pCB6+ pro hp53	pCB6+	p53 wt humano (2017 pb)	EcoRI - BamHI	Expresión eucariota	J.A. Pietenpol (Nashville, EEUU)
hp53 S15A	pCB6+	p53 humano 15 (S-A)		Expresión eucariota	J.A. Pietenpol (Nashville, EEUU)
hp53 S20A	pCB6+	p53 humano 20 (S-A)		Expresión eucariota	K. Vousden (Glasgow, UK)
hp53 T18A	pCB6+	p53 humano 18 (T-A)		Expresión eucariota	J.A. Pietenpol (Nashville, EEUU)

....

....Tabla 1 Cont.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
pCoC mdm2-X2	pCoC	Mdm2 de ratón	EcoRI	Expresión eucariota	M. Oren (Rehovot, Israel)
p21Waf-Luc		Promotor p21Waf -Luc	HindIII - SalI	Reportero de expresión con luciferasa de promotor de p21	M. Oren (Rehovot, Israel)
p53-Luc	p53-Luc	p53 Response elements -Luc		Reportero de expresión con luciferasa de promotor de respuesta a p53	Stratagene
GL2bHam Gadd45-Luc	pGL2b	promotor GADD45 -Luc (1800 pb)	SmaI	Reportero de expresión con luciferasa de promotor de GADD45	M. Oren (Rehovot, Israel)
14-3-3-sigma-Luc	pGL3	Promotor 14-3-3 σ -Luc	KpnI	Reportero de expresión con luciferasa de promotor de 14-3-3 σ	M. Oren (Rehovot, Israel)
pGL3-Bax-Luc	pGL3	promotor Bax - Luc (370 pb)	KpnI - SacI	Reportero de expresión con luciferasa de promotor de BAX	M. Oren (Rehovot, Israel)
Chk2-GST		Chk2 humano		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	S.J. Elledge (Houston, EEUU)
Chk2-Flag	pCMV	Chk2 wt humano		Expresión eucariota	T.D. Halazonetis (Philadelphia, EEUU)
Chk2A547-Flag	pCMV	Chk2 mutante dominante negativo		Expresión eucariota	T.D. Halazonetis (Philadelphia, EEUU)
CMVb-p300-CHA	pCMV	p300	Not I- HindIII	Expresión eucariota	A. Zantema (Leiden, Holanda)
RhoAQ63L	pCEFL-AU5	RhoA humano mutante activado		Expresión eucariota	
K-ras-val12	pCEFL	Ras humano mutante activado		Expresión eucariota	
3.1 MdmXNIF	pcDNA3.1	MdmX humano		Expresión eucariota	S.J. Berberich (Ohio, EEUU)

Tabla 2. Mutaciones puntuales generadas.

CONSTRUCCIÓN	MUTACIÓN	VECTORES
VRK1(179K-E)	179 (K-E)	pGEX-4T1 pCEFL-HA pCDNA 3.1 (-) Myc
p53 FP221+T18	18 (T-A)	pGEX-2T
hp53S15A,S20A	15 (S-A) + 20 (S-A)	pCB6+
hp53 S15A, T18A	15 (S-A) + 18 (T-A)	pCB6+
hp53 S15A, T18A, S20A	15 (S- A) + 18 (T-A) + 20 (S-A)	pCB6+

Tabla 3. Líneas celulares usadas en el estudio.

DENOMINACIÓN	ORGANISMO	TEJIDO	CARACTERÍSTICAS	PROPAGACIÓN
NCI-H1299	humana	Cáncer de pulmón de célula no pequeña	Deleción parcial en homocigosis de p53 No expresión de p53.	RPMI 1640 + 10% FBS
MCF-7	humana	Adenocarcinoma de mama	Expresión normal de p53 silvestre	D-MEM + 10% FBS
A549	humana	Carcinoma de pulmón	Expresión normal de p53 silvestre	RPMI 1640 + 10% FBS
HCT 116	humana	Carcinoma colorectal	Expresión normal de p53 silvestre	McCoy's + 10% FBS
NIH/3T3	ratón	Fibroblastos de embrión de ratón	p53 silvestre	D-MEM + 10% CS
293T	humana	Riñón	Expresión normal de p53 silvestre	D-MEM + 10% FBS
HeLa	humana	adenocarcinoma de cervix	Niveles bajos de p53	D-MEM + 10% FBS
WSI	humana	Fibroblasto de piel	Fibroblasto humano normal	D-MEM + 10% FBS
IMR-90	humana	Fibroblasto de pulmón	Fibroblasto humano normal	D-MEM + 10% FBS

Tabla 4. Principales anticuerpos primarios usados en el estudio.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	ESPECIE	DILUCIÓN DE USO APROX.	PROCEDENCIA
VC1	VRK1 (aa 267-396)	policlonal conejo	1:2000	producción propia
VE1	VRK1	policlonal conejo	1:2000	producción propia
1F6/2E4	VRK1 (aa 332-396)	monoclonal ratón	1:20000	producción propia
DO-1	p53 (aa 11-25)	monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz
Pab-1801	p53 (aa 32-79)	monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz
CM-1	p53	policlonal conejo	1:20000	S. Lain (Dundee, UK)
SMP-14	Mdm2 (aa 154-167)	monoclonal ratón	1:500	DAKO
4B2	Mdm2	monoclonal ratón	1:2000	S. Lain (Dundee, UK)
AC-15	β -actina	monoclonal ratón	1:5000	Sigma
HA.11	epítipo HA	monoclonal ratón	1:1000	BABCO
α -myc	epítipo myc	policlonal conejo	1:500	Upstate Biotech
p-p53(Thr18)-R	P-Thr-18	policlonal conejo	1:200	Santa Cruz
p-p53(Ser15)-R	P-Ser15	policlonal conejo	1:200	Santa Cruz
FTP18	P-Thr-18	monoclonal ratón	1:200	T.D. Hupp (Dundee, UK)
Ac-p53	Ac-Lys 373 y 382 en p53	Policlonal conejo	1:500	Upstate Biotech

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en clonajes y detección de VRK1 y detección de p53. Todas las secuencias en sentido 5'-3'.

DENOMINACIÓN	SECUENCIA	USO
VRK1-pCEFL-1	CCCAGATCTATGCCTCGTGTAAGCAGC TCAAGCTG	Clonación de VRK1 en vector de expresión eucariota pCEFL
Vrk1 XbaI 3'	GGGTCTAGACTTCTGGACTCTTTCTGG TTCTTGAACGGG	Clonación de VRK1 en vector de expresión eucariota pCEFL
VRK1-pET-1	CCCGGATCCATGCCTCGTGTAAGCAGC TCAAGCTG	Clonación de VRK1 en vector de expresión bacteriana pET23a
VRK1-pET-2	CCCCTCGAGCTTCTGGACTCTTTCTGG TTCTTGAACGGG	Clonación de VRK1 en vector de expresión bacteriana pET23a
mVRK1A	ATGCCCCGTGTAAGCAGCTC	amplificación VRK1 de ratón
mVRK1B	GAAGTACCTTGGTGTTCTAAG	amplificación VRK1 de ratón
mVRK2A	GGATTGGTCTGACTGATTCAAAGG	amplificación VRK2 de ratón
mVRK2B	GGAGTGGCCCCATCCAGGAGGAGTG	amplificación VRK2 de ratón
mVRK3A	TGACGCCTCATGTGTCATCCGTTCC	amplificación VRK3 de ratón
mVRK3B	TTGTCCTGGTGAATGCCAAGCCG	amplificación VRK3 de ratón
Pex2hVRK1-fwd	CCAACGAGCTGCAAAACC	Amplificación VRK1 humana RT-PCR
Pex2hVRK1-rev	TGTCATGTAGACCAGACCCCC	Amplificación VRK1 humana RT-PCR
Hp53pex1	CCCCAGCCAAAGAGAAACC	Amplificación p53 humana RT-PCR
Hp53pex2	TCCAAGGCCTCATTGAGCTCT	Amplificación p53 humana RT-PCR
GAPDH3	TTGTACATTTGGTACATCAATCCA	Amplificación GAPDH humana RT-PCR
GAPDH5	GTGTACCGGAGGTTCTCATTCTGG	Amplificación GAPDH humana RT-PCR

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Características de VRK1 endógena

1.1. *VRK1 se expresa en diversas líneas celulares humanas*

Nezu y colaboradores (Nezu et al., 1997) identificaban a las proteínas de la familia VRK (*Vaccinia-related kinases*) VRK1 y VRK2 y describían estas como expresadas ubicuamente en todos los tejidos analizados en su estudio, así como en diversas líneas celulares tumorales, tal como mostraban sus datos de expresión de ARN mensajero. Nosotros quisimos analizar la expresión de VRK1 en las líneas celulares que iban a ser usadas para los posteriores experimentos, así como en otras líneas celulares, tumorales o no. Para ello analizamos la expresión de proteína mediante “Western blot” de extractos celulares totales procedentes de un cultivo asincrónico con anticuerpos específicos frente a VRK1 (Fig. 10). VRK1 se expresa en todas las líneas celulares probadas. Ninguna de las líneas tumorales mostradas presenta la pérdida de expresión de VRK1. Al cuantificar los niveles de VRK1 con respecto al de proteína total, estos son variables y sólo la línea celular 293-T presenta niveles anormalmente altos en esta muestra (Fig. 10). VRK1 se expresa también en las líneas no tumorales probadas, aunque en unos niveles ligeramente inferiores.

Además la VRK1 detectada mediante “Western blot” es predominantemente nuclear, como se muestra al realizar como ejemplo el inmunoblot sobre extractos procedentes de la fracción nuclear o citosólica de células Hela (Fig. 11).

1.2. *VRK1 se expresa por igual en todas las fases del ciclo celular*

Puesto que se ha propuesto a la familia de kinasas VRK, y en concreto a VRK1 y VRK2, como involucradas en procesos de control del crecimiento y proliferación celular, quisimos analizar la expresión y localización de la proteína VRK1 a lo largo del ciclo de división celular. Para poder observar la expresión de VRK1 en estas células en condiciones normales, no usamos compuestos para

sincronizarlas en fases concretas del ciclo, dado que desconocemos a priori si pudieran tener algún efecto sobre la localización o expresión de la quinasa.

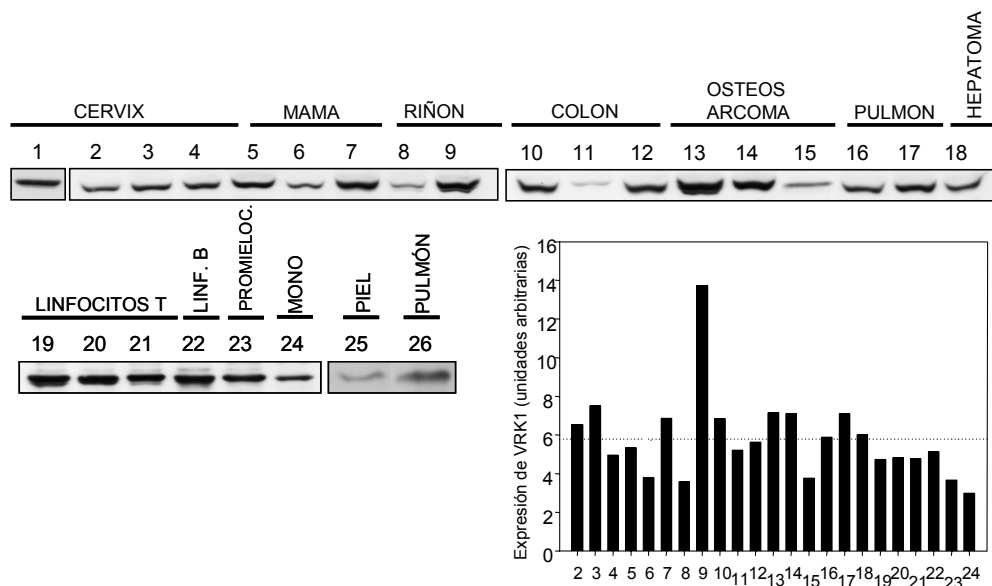


Figura 10. Expresión de VRK1 en líneas celulares. Detección de VRK1 endógena con anticuerpos específicos en diferentes líneas celulares y los tejidos de procedencia. Se muestra además la representación de la expresión relativa normalizada de VRK1 en algunas líneas tumorales. 1: HeLa; 2: C41; 3: SiHa; 4: SW756; 5: Cal51; 6: H9528T; 7: MCF-7; 8: A498; 9: 293T; 10: Colo32; 11: HCT116; 12: WiDr; 13: OSA; 14: RM513; 15: U2-OS; 16: A549; 17: H1299; 18: HepG2; 19: Jurkat; 20: jy; 21: HPBALL; 22: jijoye; 23: HL60; 24: COS-1; 25: WSI; 26: IMR-90.

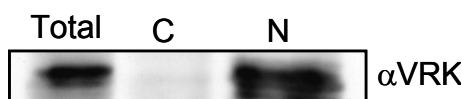


Figura 11. VRK1 se detecta en la fracción nuclear. Detección de VRK1 con el anticuerpo específico VC1 en extracto total, citosólico (C) o nuclear (N) de células HeLa.

Para conocer la expresión de VRK1 utilizamos un doble marcaje de ADN y antígeno de células en cultivo asincrónico que sometimos a análisis por citometría de flujo. De este modo podemos analizar la expresión de VRK1 en las distintas fases del ciclo de división celular, diferenciadas según la cantidad de ADN presente en las células. VRK1 parece estar presente en todas las fases del ciclo y en similar medida tanto en una línea celular tumoral como en fibroblastos

normales (Fig. 12). El ligero aumento en la detección de VRK1 encontrado en las células según pasan la fase S y entran en mitosis se debería a un aumento del tamaño celular ya que el mismo incremento se detecta con esta técnica en una proteína usada como control sin cambio a través del ciclo.

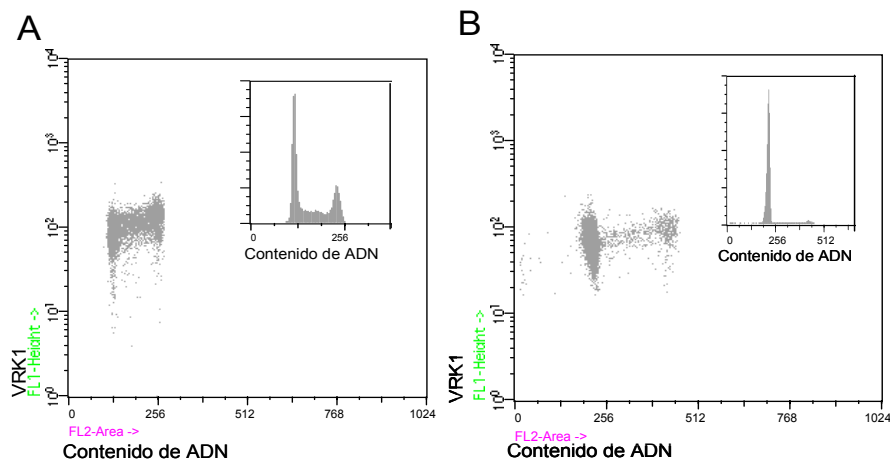
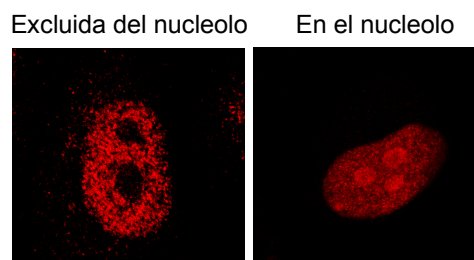


Figura 12. Expresión de VRK1 a lo largo del ciclo celular. Expresión de VRK1 detectada con el anticuerpo VC1 frente al contenido en ADN, medido por marcaje con yoduro de propidio. También se muestra el perfil de ciclo según el contenido en ADN. **A)** Línea tumoral HCT116. **B)** Línea de fibroblasto normal IMR-90.

Durante interfase, VRK1 se encuentra generalmente excluida del nucleolo. Sin embargo, se ha podido observar una localización nucleolar en algunos casos, sin que sepamos por el momento el mecanismo que media esta localización específica (Fig.13).

Figura 13. Localización de VRK1 con respecto al nucleolo. Diferente localización de VRK1 con respecto al nucleolo observada en inmunofluorescencias con anticuerpo α -VRK1 marcado con Cy3 en células H1299.



Para observar la localización de VRK1 en distintos momentos del ciclo de división celular realizamos inmunofluorescencia con anticuerpos específicos en

líneas celulares en cultivo (Fig. 14). VRK1 se localiza principalmente en el núcleo durante interfase y dispersa por toda la célula en mitosis, cuando la envuelta nuclear esta desorganizada. En esta fase VRK1 no parece asociarse con los cromosomas condensados ni tener una localización específica. VRK1 se vuelve a localizar rápidamente en el núcleo una vez que la envuelta nuclear es organizada de nuevo en la telofase, antes de la citocinesis.

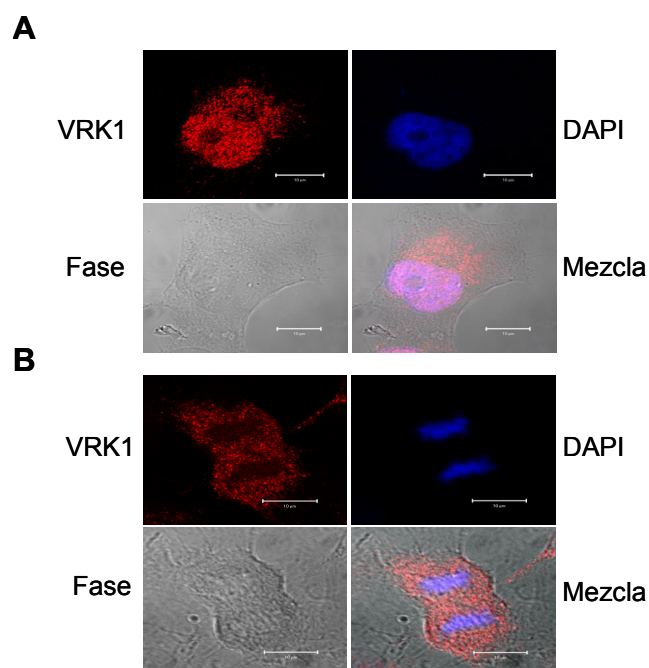


Figura 14. Localización de VRK1 endógena en la línea celular A549. Localización de VRK1 (VC1- rojo) y el ADN (DAPI-azul) en interfase (A) y mitosis (B). Línea: 10 μm.

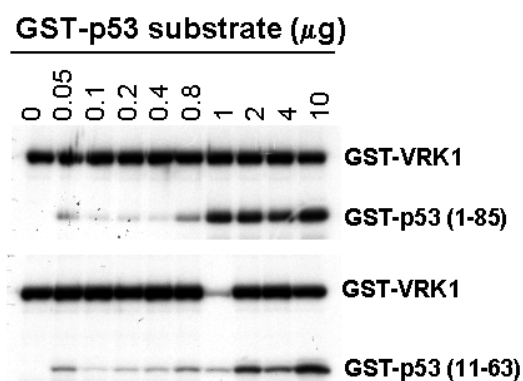
2. VRK1 y p53

2.1. La cinética de la fosforilación de p53 por VRK1 es consecuente con una acción *in vivo*

La fosforilación de p53 *in vitro* por VRK1 había sido descrita con anterioridad (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Quisimos analizar más en detalle la cinética de esta fosforilación. Para ello realizamos ensayos quinasa *in vitro* con ATP radiactivo como donador de fosfato y usando como sustrato concentraciones

crecientes de dos proteínas de fusión con GST de dos fragmentos de p53 diferentes conteniendo el residuo treonina 18 (Fig. 15). Cuantificando la cantidad de radiactividad incorporada se calculó la K_m de la reacción, resultando de 1 μ M para ambas construcciones, concentración que es consistente con los cambios en las concentraciones de p53 intracelular.

Figura 15. Ensayo de fosforilación de p53 por VRK1 usando dos construcciones GST-p53 diferentes. En estas reacciones se usó 2,5mM de $MgCl_2$ y 5 μ M de ATP. De este modo se calculó la K_m de la reacción de fosforilación.



2.2. VRK1 no fosforila a p53 en la región carboxilo-terminal *in vitro*

Para ver si VRK1 era capaz de fosforilar a p53 en otras regiones distintas de la amino terminal realizamos un ensayo quinasa *in vitro* con ATP radiactivo usando como sustrato proteínas de fusión a GST conteniendo los aminoácidos 1 al 85, 90 al 290 o 290 a 390 de p53 (Fig. 16). La construcción con los aminoácidos 1 al 85 (FP221) es fosforilada específicamente en la treonina 18 como se demuestra al perderse la fosforilación por mutación en ese residuo. Una marca residual de fosforilación se puede observar en la construcción p53(290-390)GST, aunque no refleja una fosforilación significativa si la comparamos con la obtenida en la región amino terminal.

2.3. La fosforilación de p53 por VRK1 impide su unión con MDM2 *in vitro*

En atención al análisis de la estructura de la unión entre p53 y su principal regulador negativo Mdm2, el residuo treonina 18 se identificó como fundamental

para el mantenimiento de esta interacción. Esos datos han sido confirmados por diversos autores que han establecido la importancia de este residuo mediante experimentos de competencia de péptidos (Jabbur et al., 2002; Kussie et al., 1996; Schon et al., 2002).

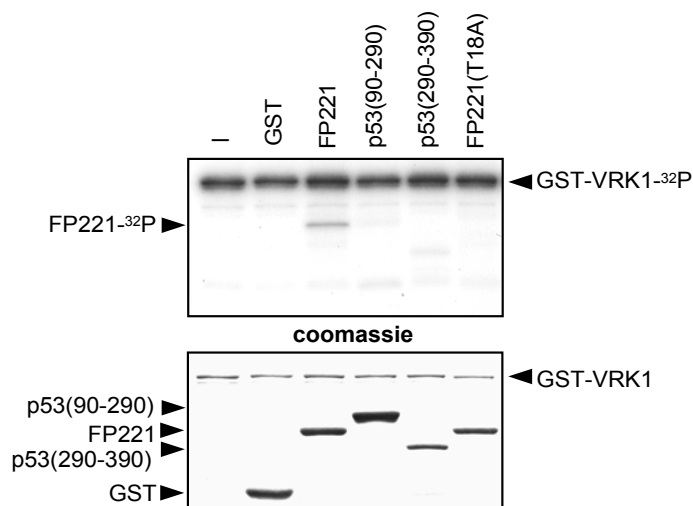


Figura 16. Fosforilación *in vitro* de distintos fragmentos p53 por VRK1. Autoradiografía y tinción con azul de Coomassie de las proteínas de fusión indicadas tras ensayo quinasa *in vitro*.

Nuestra intención era confirmar que efectivamente la fosforilación por VRK1 de p53 en treonina 18 disminuía la interacción de este por Mdm2. Para ello realizamos un ensayo de unión entre Mdm2 expresado *in vitro* y la proteína de fusión GST-p53 FP221, que contiene los aminoácidos 1 al 85, bien previamente fosforilada por VRK1 o bien no (Fig. 17). En el panel Fig.17-A se muestra la fosforilación previa de la construcción de p53 FP221 en paralelo pero usando p53 radiactivo. La construcción se fosforila por la proteína VRK1 tanto fusionada a GST como a epítopo de histidina. En la figura 17, parte B, se muestra la cantidad de Mdm2 unido a p53 en el ensayo y su cuantificación relativa. Efectivamente la proteína de fusión con la parte amino terminal de p53 es capaz de interaccionar con Mdm2 y arrastrarlo en el ensayo de unión. Esta interacción se ve disminuida

cuando, previamente al ensayo, la proteína GST-p53 es fosforilada por VRK1. El ensayo de fosforilación fue realizado en condiciones no estequiométricas y no excluimos que parte de las moléculas de p53 no estén fosforiladas, por lo que previsiblemente la bajada en la unión podría ser aun mayor. De igual forma ocurre cuando la proteína de fusión utilizada es un mutante puntual con la sustitución treonina 18 a alanina, tal como estaba previamente descrito para esta sustitución (Jabbur et al., 2002; Schon et al., 2002). Comprobamos que efectivamente p53 era fosforilada en el residuo treonina 18 por VRK1 mediante el reconocimiento específico por un anticuerpo monoclonal que reconoce solamente la forma fosforilada en treonina 18 de p53.

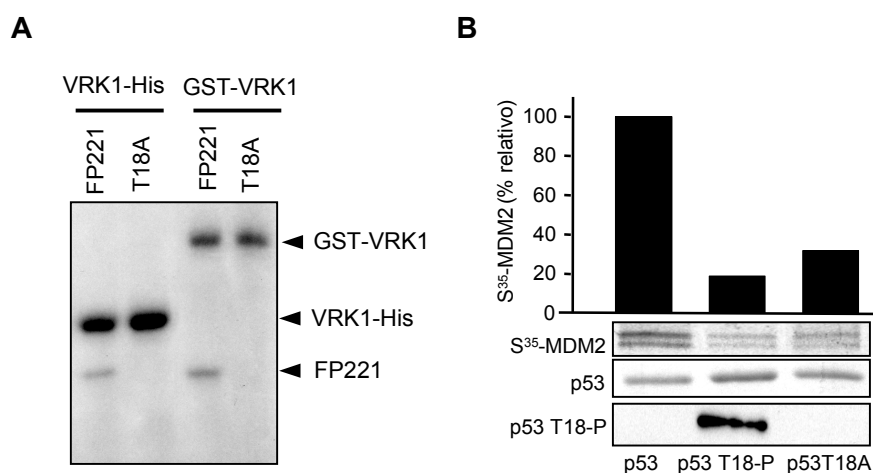


Figura 17. La fosforilación en treonina 18 por VRK1 impide la unión de p53 a Mdm2. **A)** Fosforilación previa de p53 con ATP radiactivo usando dos proteínas de fusión de VRK1 con epítomos diferentes. **B)** Ensayo de unión de p53 a Mdm2 marcado radiactivamente con p53 bien previamente fosforilado en frío o bien no. Se muestra la cuantificación y la detección de la fosforilación en treonina18 con un anticuerpo específico.

Este efecto podía ser debido sin embargo también a la fosforilación por parte de VRK1 del dominio de interacción con p53 en Mdm2. Comprobamos que VRK1 no era capaz de fosforilar a Mdm2 en su parte amino terminal mediante un ensayo quinasa con ATP marcado radiactivamente usando como sustrato una proteína de fusión con GST de la parte amino terminal de Mdm2 (aa 1-188) (Fig.

18). Efectivamente en las condiciones en las que VRK1 fosforila a p53 en treonina 18, esta no lleva a cabo fosforilación alguna *in vitro* de Mdm2 en su parte amino terminal, región de unión a p53.

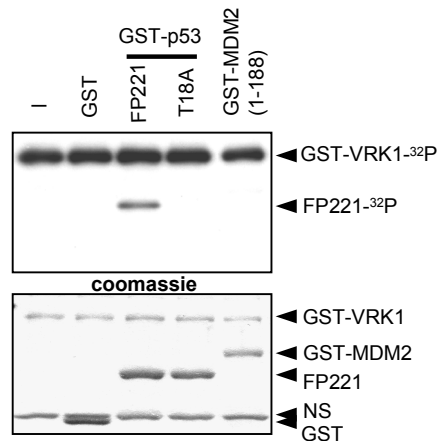


Figura 18. VRK1 no fosforila la porción amino-terminal de Mdm2. Ensayo quinasa *in vitro* con ATP radiactivo usando VRK1 y el fragmento amino-terminal de p53 FP221 (silvestre o mutado en treonina 18) o de Mdm2 fusionado a GST como sustrato. NS: banda inespecífica.

RESULTADOS

2.4. La sobre-expresión de VRK1 provoca la estabilización de p53 exógenamente expresado

Decidimos ver el efecto de la sobre-expresión de VRK1 sobre p53 y para ello usamos una proteína p53 expresada exógenamente, lo que nos permitía introducir mutaciones o modificaciones, en la línea celular tumoral H1299, sin expresión alguna de p53. Transfectamos estas células con un vector de expresión de p53 humana sólo o junto con el vector que codifica la proteína VRK1. El análisis por "Western blot" de los lisados celulares indica un aumento en los niveles de p53 tras la sobre-expresión de VRK1 comparado con la expresión de p53 por si sola (Fig. 19A). Para comprobar que efectivamente el efecto dependía de la expresión de VRK1, realizamos el mismo experimento de cotransfección usando concentraciones crecientes del plásmido para VRK1. La acumulación de p53 parece ser dependiente de la cantidad de vector de VRK1 transfectado (Fig. 19B).

Inmunoprecipitando el p53 total y realizando posterior inmunoblot con anticuerpos para detectar específicamente la fosforilación en posición treonina

18, comprobamos que el p53 acumulado por efecto de la sobre-expresión de VRK1 esta intensamente fosforilado en este residuo (Fig. 19C).

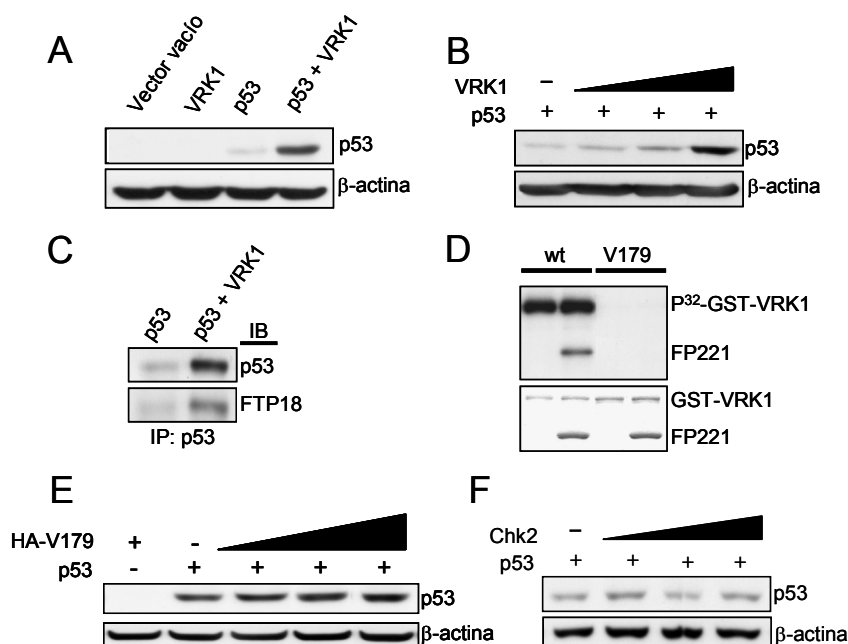


Figura 19. Estabilización de p53 tras sobre-expresión de VRK1. **A)** Se transfectaron en la línea H1299 los vectores de expresión correspondientes para VRK1-myc (8μg) y hp53 (1μg) por separado o juntos, y tras 36 h postransfección se detectaron los niveles de p53 con anticuerpos específicos. **B)** Se trataron las células igual que en A salvo que se añadieron cantidades crecientes (0, 3, 5 y 8 μg) del vector para VRK1. **C.** Se inmunoprecipitó el p53 total en extractos obtenidos de A y se detectó la fosforilación de p53 en treonina 18 con el anticuerpo específico FTP18. **D)** Ensayo de fosforilación in vitro de p53 por VRK1 silvestre o el mutante K179E (V179). **E)** Se sobre-expresó el mutante inactivo de VRK1 junto con p53 como en B y se detectaron los niveles de p53. **F)** Cotransfección con un vector de expresión para Chk2 humana de la misma forma que en B. En todos los casos se muestra la actina como control de carga.

Para ver si este efecto era dependiente de la actividad quinasa de VRK1, introdujimos una mutación puntual en la secuencia de VRK1 mediante la que sustituimos la lisina 179 por ácido glutámico. Este es un aminoácido esencial para la funcionalidad del dominio de unión a ATP típico en las proteínas quinasas (Hanks and Hunter, 1995). Clonamos esta secuencia mutante tanto en un vector de expresión de proteína recombinante en bacterias como de expresión en

mamíferos. Con un ensayo quinasa con ATP radiactivo comprobamos que efectivamente la proteína no tiene ninguna actividad quinasa en la fosforilación de un sustrato o en su auto-fosforilación (Fig. 19D). Si usamos este mutante en cotransfección con p53 no somos capaces de observar un aumento significativo en los niveles de p53 tras la sobre-expresión de VRK1, con lo que concluimos que la actividad quinasa de VRK1 es esencial para el efecto de aumento de la estabilidad de p53 exógenamente expresado (Fig. 19E).

Se ha descrito la fosforilación en serina 20 y treonina 18 de p53 por parte de la quinasa Chk2 (Craig et al., 2003). Para ver si el efecto provocado por VRK1 era específico, co-transfectamos como control una construcción que codifica para la quinasa Chk2 junto con p53 en similares condiciones a las utilizadas con VRK1 (Fig. 19F). La sobre-expresión de Chk2 no produce la acumulación de p53 exógeno en la línea celular H1299 en la misma forma en que lo hace VRK1.

Típicamente, los niveles de p53 se controlan a través de modificaciones postraduccionales, más que por nueva síntesis proteica, lo que permite una rápida respuesta. Para ver si el efecto de VRK1 sobre p53 era postraducciona, co-transfectamos la línea celular H1299 con VRK1 y p53 en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica que actúa bloqueando la traducción del ARN mensajero. Preparamos extractos celulares a diferentes tiempos tras la adición de cicloheximida y realizamos “Western blot” para detectar la proteína p53 con un anticuerpo específico (Fig. 20A). En presencia de cicloheximida, la cotransfección con VRK1 produce un aumento de la estabilidad de p53 medible por su menor tasa de degradación. Representando los niveles de p53 normalizados en una gráfica y realizando la correspondiente regresión lineal, obtenemos una vida media de 8 horas para el p53 transfectado en estas condiciones (visiblemente mayor que la del p53 endógeno) y de 13,5 h en el caso de co-expresión con VRK1.

Para excluir algún efecto transcripcional sobre la expresión de p53, medimos los niveles de ARN de p53 mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real y análisis en gel de agarosa (Fig. 20B). Los niveles de ARN son similares en

células transfectadas con el vector de p53 sólo y en las co-transfectadas con el plásmido para VRK1.

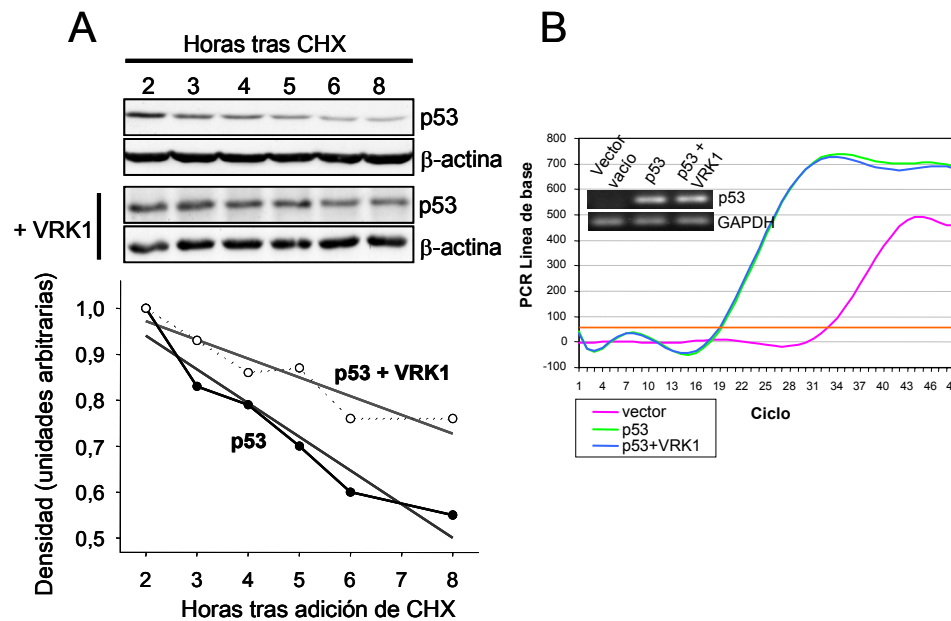


Figura 20. VRK1 estabiliza a p53 por un efecto postraducciona. A) VRK1 aumenta la estabilidad de p53 medida por el descenso de su tasa de degradación en presencia de cicloheximida. **B)** La sobre-expresión de VRK1 no afecta a la transcripción del gen de p53. Los niveles de ARNm de p53 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa y el resultado se muestra en la gráfica así como en gel de 1% agarosa del producto final.

En respuesta a estrés, tras su estabilización, p53 se acumula en el núcleo celular, donde es activo como factor de transcripción. Determinamos la localización celular de p53 y VRK1 tras sobre-expresar ambas proteínas en la línea celular H1299. El p53 acumulado tras la sobre-expresión de VRK1 lo hace en el núcleo (Fig. 21A). También tiene esta localización al estar expresado en solitario, como es típico en un p53 exógenamente introducido. Allí co-localiza con VRK1, también nuclear.

Una consecuencia de esta acumulación nuclear podría ser la activación de la transcripción dependiente de p53, si es que esta proteína es activa como transactivador de la transcripción. Para demostrar esto, transfectamos las células

con p53, bien solo o con VRK1, y con diferentes construcciones reporteras de la actividad transcripcional dependiente de p53 (Fig. 21B). Estos son un vector con elementos de respuesta a p53 sintéticos en tándem, la región de respuesta a p53 del promotor de p21 o la del gen de la proteína 14-3-3 σ , todos ellos acoplados al gen de la luciferasa. La actividad luciferasa en este ensayo es sinónimo de actividad transcripcional dirigida por p53. La expresión en las células de p53 lleva a un aumento de la actividad luciferasa, debido a la sobre-expresión de la proteína tras la transfección. Esta actividad se ve aumentada aun más con la introducción de VRK1, sobre todo con el reportero sintético. Por lo tanto el p53 acumulado por VRK1 tiene capacidad de dirigir la transcripción dependiente de p53 y es por tanto activo como factor de transcripción.

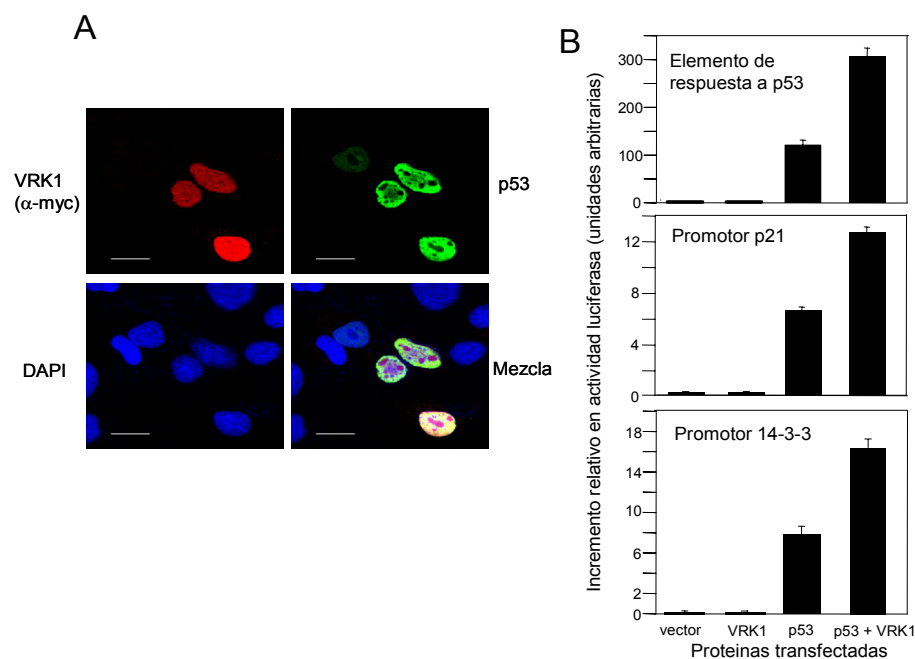


Figura 21. VRK1 induce la acumulación nuclear de un p53 transcripcionalmente activo. **A)** Las células H1299 transfectadas con VRK1 y p53 tal como se indica anteriormente, fueron fijadas y tratadas para la inmuno-detección de p53 (Cy2-verde) y VRK1 (Cy3-rojo) exógeno. En azul tinción nuclear con DAPI. **B)** La línea H1299 fue transfectada con vectores para VRK1, p53 o ambos a la vez y con los vectores reporteros de luciferasa que se indican. Se midió la actividad luciferasa dependiente de la transcripción de p53 tal como se detalla en materiales y métodos.

2.5. VRK1 estabiliza a p53 por un mecanismo independiente de Mdm2

Uno de los mecanismos más comunes por los que se consigue la estabilización de la proteína p53 es interrumpiendo su degradación promovida por Mdm2. La interrupción de la interacción entre p53 y Mdm2 es uno de los efectos provocados por distintos estímulos activadores de p53, y modificaciones postraduccionales en p53 tienen un papel activo en este fenómeno (Chène, 2003; Vousden, 2002). Tal como se ha descrito anteriormente, al residuo de treonina en posición 18 de p53 se le ha atribuido un papel esencial en el mantenimiento de esta interacción, y a su fosforilación en su interrupción (Bottger et al., 1999; Jabbur et al., 2002; Sakaguchi et al., 2000; Schon et al., 2002). Puesto que VRK1 es capaz de fosforilar a p53 en este residuo interrumpiendo la interacción entre p53 y Mdm2 *in vitro*, es tentativo pensar que el desencadenante de la acumulación de p53 por parte de VRK1 podría ser este fenómeno, con la consiguiente estabilización de p53. Para probar esto, primero realizamos un experimento de cotransfección en la línea celular H1299 para ver si la sobre-expresión de VRK1 era capaz de abolir la degradación de p53 promovida por Mdm2. Para ello expresamos exógenamente la proteína p53 sola o en combinación con Mdm2, VRK1 o ambas a la vez (Fig. 22A). Tras sobre-expresión de Mdm2 vemos una caída en los niveles de expresión de p53. Cuando es VRK1 lo que sobre-expresamos se produce una estabilización de la proteína. Al expresar ambas proteínas a la vez, p53 recupera sus niveles sólo parcialmente.

Esto puede ser debido a una interrupción parcial de la degradación de p53 por Mdm2 o a una acumulación de p53 partiendo de los niveles bajos observados tras la adición de Mdm2. Para finalmente dilucidar la participación de Mdm2 en esta estabilización, realizamos el mismo experimento de cotransfección de p53 y VRK1 en una línea celular inmortalizada a partir de fibroblastos de embriones de ratón derivados del ratón doble KO para p53 y Mdm2 que por tanto no tiene expresión alguna ni de p53 ni de Mdm2 (Fig. 22B). En estos fibroblastos, la sobre-expresión de VRK1 es capaz de dirigir la estabilización de p53

exógenamente expresado aun en ausencia de Mdm2. Por lo tanto, el efecto de VRK1 sobre p53 es, al menos en parte, independiente de Mdm2.

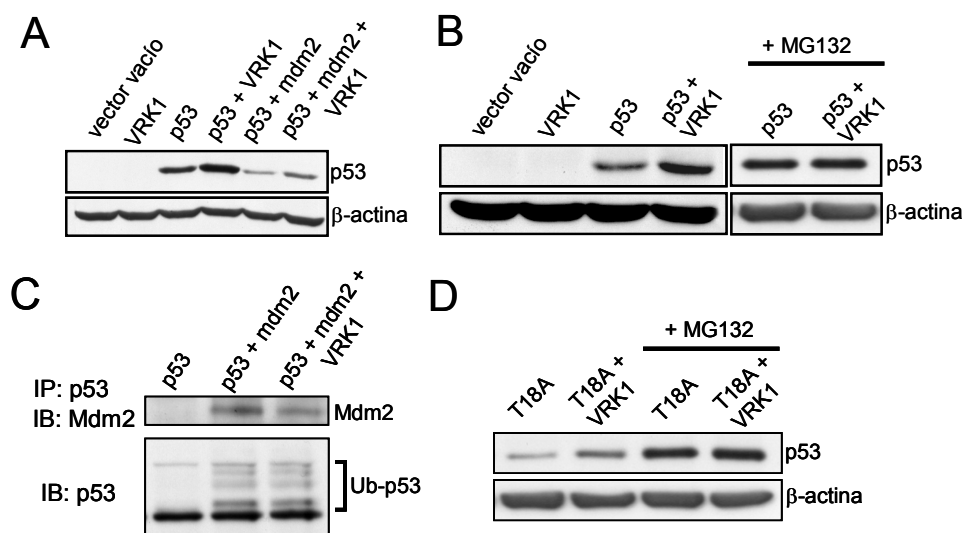


Figura 22. La estabilización de p53 por VRK1 es, al menos parcialmente, independiente de Mdm2. **A)** Las células H1299 se transfectaron con 1 μ g de plásmido de expresión pCB6+p53 solo o junto con los vectores de expresión pCOC-Mdm2 (2 μ g) y pCDNA-VRK1 (4 μ g) tal como se indica. En todo caso se añadió 1 μ g de plásmido para ubiquitina. Se prepararon extractos totales 36 horas postransfección y se analizaron los extractos mediante inmunoblot con los anticuerpos específicos correspondientes. **B)** MEFs derivados del doble KO (p53^{-/-}; Mdm2^{-/-}) se transfectaron con las proteínas indicadas. Las células se procesaron como en A y 6 horas antes de la lisis se añadió el inhibidor del proteosoma MG132 cuando se indica. **C)** Las células H1299 se trataron como en A y se trataron con MG132 25 μ M 6 horas antes de la lisis. Se inmunoprecipitó el p53 total con el anticuerpo CM1 y se detectó en inmunoblot con anticuerpos monoclonales específicos tanto el p53 inmunoprecipitado como el Mdm2 coinmunoprecipitado. Se muestra la forma ubiquitinada de p53. **D)** La línea celular H1299 se transfectó con plásmido para la expresión de p53 con la sustitución T18A (1 μ g) con o sin pCDNA-VRK1 (8 μ g). Las células se procesaron como en B.

Esto pone en duda la importancia de la fosforilación de la treonina 18 de p53 para su acumulación tras sobre-expresión de VRK1. VRK1 debe estar actuando por algún otro mecanismo, bien la fosforilación en otro residuo de p53 o bien en otra molécula reguladora de la actividad de p53. La adición a estas células del inhibidor del proteosoma MG132 provoca un aumento en los niveles de p53 que no puede ser superado por la sobre-expresión de VRK1 (Fig. 22B). Esto indica que, en ausencia de Mdm2, otras ubiquitina ligasas están marcando a

p53 para su degradación en el proteosoma y estas moléculas son candidatas a ser mediadoras de la acción de VRK1.

En un experimento similar, tras sobre-expresión de p53, Mdm2 y VRK1 en la línea celular H1299, los extractos fueron coinmunoprecipitados con anticuerpos frente a p53 y se realizó un “Western blot” contra Mdm2 para detectar el Mdm2 que se encuentra formando un complejo con p53 (Fig. 22C). Se pudo observar una pequeña reducción de Mdm2 unido a p53 tras sobre-expresión de VRK1, indicando que este efecto podría estar ocurriendo, aunque en ningún caso parece como posible responsable de la notable estabilización de p53. Al medir la ubiquitinación de p53 por parte de Mdm2 en presencia del inhibidor MG132, VRK1 no parece afectar significativamente la cantidad de p53 ubiquitinado por Mdm2.

Más aun, cuando usamos la proteína de p53 con una sustitución puntual del aminoácido treonina 18 por otro no fosforilable como es la alanina, VRK1 es capaz de dirigir su estabilización cuando son sobre-expresadas en la línea celular H1299 (Fig. 22D), si bien las propiedades de estabilidad de tal mutante están alteradas debido a esa sustitución (Jabbur et al., 2002; Schon et al., 2002). Ese mutante es todavía susceptible de degradación por el proteosoma como demuestra su acumulación en presencia de MG132, lo que de nuevo indica la presencia de otros mecanismos de degradación de p53 independientes de Mdm2 o al menos de la interacción normal entre p53 y Mdm2.

2.6. Posible cooperación de VRK1 con otras quinasas en la activación de p53.

El patrón concreto de modificaciones postraduccionales que se producen en p53 en respuesta a estrés podría determinar la respuesta concreta dirigida por este. Es previsible que una serie de modificaciones actúen en conjunto para asegurar una correcta y completa activación de p53. En este sentido, podría ser posible que VRK1 estuviera actuando en colaboración con otras quinasas o reguladores de p53, conocidos o no, para promover su activación. La fosforilación

en treonina 18 podría ser así sólo un elemento más, no suficiente y ni siquiera indispensable para la acumulación de p53 dependiente de VRK1.

Para estudiar estos fenómenos analizamos el efecto de la sobre-expresión de VRK1 sobre la estabilidad y acumulación de p53 con sustituciones en distintos residuos fosforilables y que se sabe son fosforilados por otras quinasas en respuesta a estrés. Usamos la línea celular H1299 para cotransfectar vectores de expresión de p53 silvestre o con distintas sustituciones puntuales solos o en combinación con un vector de expresión para VRK1 (Fig. 23). La propiedades de estabilidad de cada mutante son diferentes y es por eso que los niveles de partida son distintos entre unos y otros aun siendo todos ellos expresados a partir de la misma cantidad del mismo vector de expresión. Eso hace tomar los resultados derivados de estas proteínas p53 mutadas con cautela.

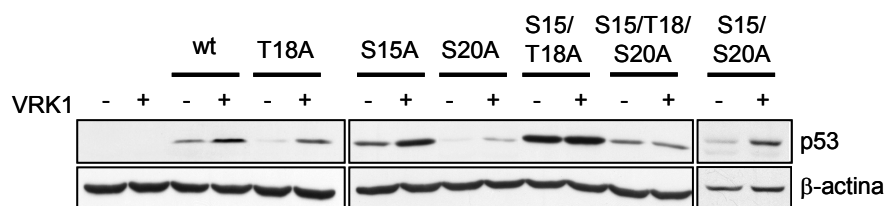


Figura 23. Acumulación de mutantes en sitios de fosforilación de p53 por VRK1. 1μg de p53 silvestre (wt) o mutante cotransfectado o no con 4μg de VRK1. "Western blot" para detectar p53 total con una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos.

Como habíamos descrito anteriormente, VRK1 es capaz de provocar la acumulación tanto del p53 silvestre como del mutante en el residuo treonina 18 a alanina. Este mutante, aun no siendo intrínsecamente más estable, es propenso de por sí a la acumulación por ser menos susceptible a la degradación por parte de Mdm2 debido al papel esencial que tiene el puente de hidrógeno que se establece entre la treonina 18 y la asparagina 21 de p53 para la interacción de este con Mdm2 (Jabbur et al., 2002). De igual forma se puede apreciar una acumulación, aunque en distinta medida, del mutante serina 15 a alanina, serina

20 a alanina y del doble mutante serina 15, 20 a alanina. Solamente se deja de apreciar este efecto con el doble mutante ser15, thr18 a alanina (aunque los niveles de la proteína cuando se expresa en solitario ya son bastante altos de por sí y puede que no podamos conseguir un efecto acumulativo mayor por tener esta proteína ya una estabilidad bastante aumentada) y el serina 15, 18, 20 a alanina. Sólo cuando las mutaciones en serina 15 y en serina 20 están en combinación con la 18 se pierde el efecto de VRK1 sobre p53. Esto podría ser un indicio de posible efecto cooperativo entre VRK1 y otras quinasas que fosforilan a p53 en serina 15 o 20. Según esto VRK1 podría dirigir la acumulación de p53 mutado en treonina 18 a través de algún efecto mediado por modificaciones en otros residuos (serina 15 o serina 20) que no es una fosforilación directa. Los mutantes en estos residuos se acumularían por el efecto de la fosforilación directa de treonina 18 por parte de VRK1. Tan solo cuando se impide la fosforilación de alguno de estos residuos en combinación con treonina 18 se elimina el efecto de VRK1 sobre la estabilidad de p53.

Las proteínas candidatas serían las de la familia de la PI 3-quinasa ATM y ATR, que dirigen la fosforilación de serina 15 y serina 20 en p53. Unos inhibidores establecidos de esta familia de quinasas, incluidas ATM, ATR y DNA-PK son cafeína y wortmanina (Sarkaria et al., 1999; Sarkaria et al., 1998). Realizamos el experimento de sobre-expresión de p53 y VRK1 en H1299 en presencia de estos inhibidores (Fig. 24). VRK1 es capaz de promover la estabilización de p53 en presencia de hasta 1mM de cafeína y 30 μ M de wortmanina, aunque menos evidente en este último caso. También incluimos el inhibidor de la quinasa MEK PD098059 a 30 μ M como control, que tampoco tiene efecto sobre la estabilización de p53 promovida por VRK1. Por lo tanto no parece que la actividad de VRK1 sobre p53 se vea afectada por este grupo de quinasas.

Algunos estudios señalan la fosforilación del residuo serina 20 y treonina 18 por parte de las quinasas Chk1 y 2 por un mecanismo secuencial en el que previamente existe una fosforilación y activación de estas quinasas por otras como ATM y ATR. Nos propusimos estudiar una posible interacción o

cooperación entre la quinasas de la familia Chk, en concreto Chk2, supuestamente responsable de una fosforilación de p53 treonina 18, y VRK1. Primero vimos si VRK1 era capaz de fosforilar a Chk2 tal como lo hace ATM, por si pudiera estar provocando la fosforilación de treonina 18 de una forma indirecta. Realizamos un ensayo quinasas con ATP radiactivo *in vitro* usando las proteínas de fusión GST-VRK1 y Chk2KD-GST, sin actividad quinasas propia, para excluir cualquier auto-fosforilación (Fig. 25A). VRK1 no parece fosforilar a Chk2 al menos *in vitro*.

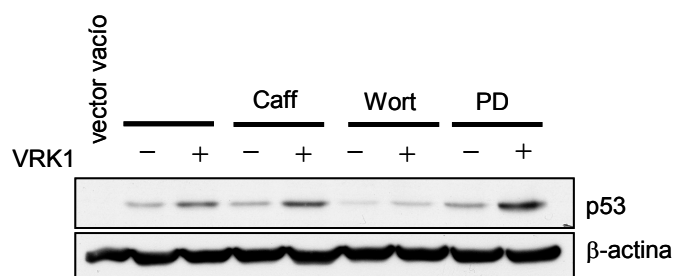


Figura 24. Estabilización de p53 por VRK1 en presencia de inhibidores. “Western blot” de extractos de células H1299 transfectadas con p53 y con o sin VRK1 y tratadas con los inhibidores indicados. Caff: cafeína; Wort: wortmanina; PD: PD098059.

Realizamos también el experimento estabilización de p53 por sobre-expresión de VRK1 en presencia del mutante dominante negativo de Chk2, Chk2A347 (Fig. 25B). VRK1 es capaz de dirigir la acumulación de p53 en presencia de este mutante excluyendo cualquier implicación de la quinasas Chk2 en la acumulación de p53 tras sobre-expresión de VRK1.

2.7. VRK1 y el regulador de p53 Mdm4 (MdmX)

Otra de las moléculas que interaccionan con el dominio amino terminal de p53 es Mdm4 (MdmX) (Bottger et al., 1999). Aunque inicialmente descrito como regulador negativo (Parant et al., 2001), la sobre-expresión de MdmX estabiliza y activa p53, acumulándolo en el núcleo sin afectar a su ubiquitinación (Mancini et

al., 2004; Stad et al., 2001). El efecto de VRK1 sobre p53 podría estar mediado en alguna medida por MdmX, en concreto liberando la actividad represora de este, y para comprobar esto realizamos experimentos de cotransfección en células H1299 con VRK1 y MdmX junto con p53 (Fig. 26).

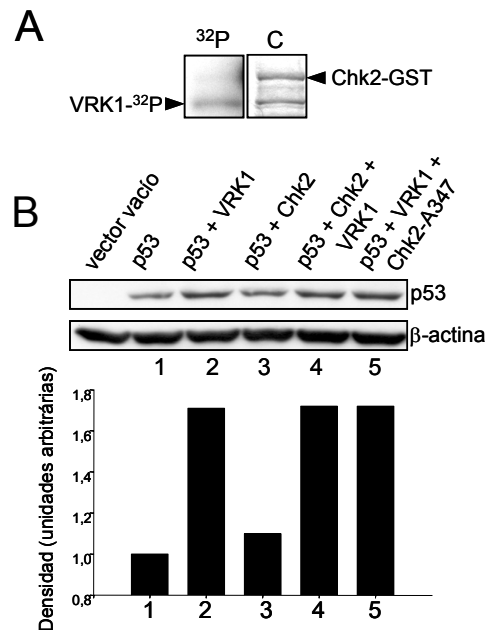


Figura 25. Chk2 no interviene en la estabilización de p53 por VRK1. **A)** Autoradiografía (³²P) y tinción de coomasie (C) de un ensayo quinasa in vitro con proteínas de fusión para VRK1 y un mutante inactivo de Chk2. **B)** Estabilización de p53 por VRK1 en presencia de Chk2 y un dominante negativo de este en la línea celular H1299. Se muestra la cuantificación del blot.

Tanto la sobre-expresión de MdmX como la de VRK1 inducen la acumulación de p53, y cuando ambos son cotransfectados a la vez, se produce un aumento en los niveles de p53 incluso mayor del obtenido con las proteínas por separado. Esto podría indicar que VRK1 y MdmX realizan su acción sobre p53 por un mecanismo independiente puesto que sus efectos son sumatorios, aunque no podemos descartar un efecto cooperativo para alcanzar una activación completa de p53 o algún otro tipo de interacción entre ambas

proteínas. No parece probable que VRK1 promueva la actividad represora de MdmX sobre p53 a la vista de este resultado.

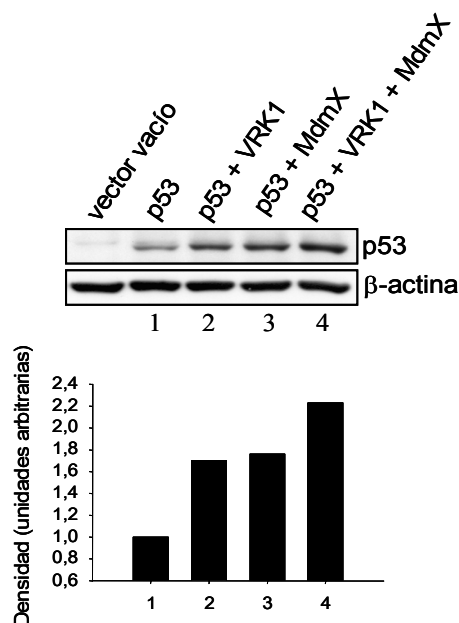


Figura 26. MdmX en la estabilización de p53 por VRK1. La línea celular H1299 se transfeció con las construcciones pCB6+p53, pVRK1-HA y p3.1MdmX-myc, como se indica en la figura y se determinaron y cuantificaron los niveles de p53 mediante "Western blot".

2.8. VRK1 promueve la acetilación de p53 por el coactivador p300

El coactivador de la transcripción p300 también interacciona con p53 a través de su región amino terminal para acetilarlo posteriormente en residuos del dominio carboxilo terminal. Se ha descrito el reclutamiento de p300 tras la fosforilación de p53 en treonina 18 y serina 20 y la posterior acetilación y estabilización de este (Dornan and Hupp, 2001). De este modo, la participación de p300 en la estabilización de p53 tras sobre-expresión de VRK1 es otro de los mecanismos candidatos. Quisimos demostrar si efectivamente VRK1 promovía la acetilación de p53 por p300 así como la formación del complejo estable entre p300 y p53. La línea celular H1299 fue co-transfectada con vectores de expresión para p53, VRK1 o Chk2 como control y p300-HA. Una vez obtenidos los extractos correspondientes, se inmunoprecipitó el p53 total con anticuerpos específicos y

se detectó la acetilación de p53 en los residuos lisina 373 y 382, acetilados por p300 (Fig. 27A).

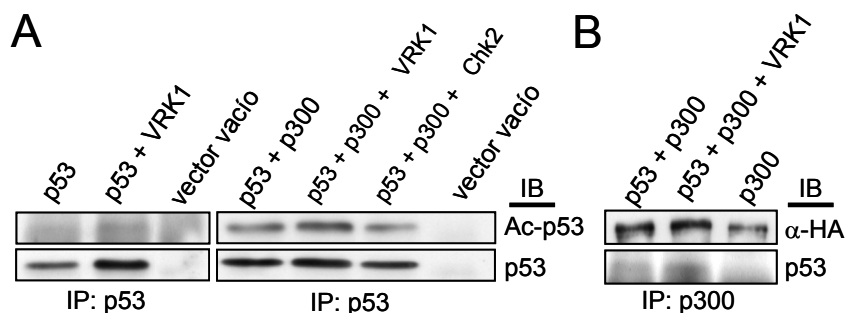


Figura 27. VRK1 promueve la acetilación de p53 por el coactivador p300. A) La línea celular H1299 fue transfectada con los vectores de expresión pCB6+p53, pCDNA-VRK1-myc, pCMV-p300-HA o pCMV-Chk2 como se indica en la figura. Se inmunoprecipitó el p53 total y se detectó la acetilación de p53 en Lys 373 y 382 con un anticuerpo específico. B) Las células se transfectaron como en A y los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo α -p300 policlonal. Se detectó en "Western blot" el p300 inmunoprecipitado con un anticuerpo frente al epítipo HA y el p53 coinmunoprecipitado con un anticuerpo específico.

VRK1 por sí misma aumenta ligeramente los niveles de acetilación de p53, previsiblemente a través del p300 endógeno, aunque en un grado muy inferior al que lo hace la introducción de p300 exógeno. Cuando ambas proteínas, VRK1 y p300, son sobre-expresadas a la vez junto con p53, se puede detectar un aumento en la acetilación de p53 comparada con la que se obtiene con el p300 exógeno solo. Como control observamos que este efecto no es provocado por la sobre-expresión de la quinasa Chk2. Para confirmar que VRK1 promueve la unión entre p53 y p300, el p300 total fue inmunoprecipitado de extractos de un experimento similar y la cantidad de p53 unido a él se detectó con un anticuerpo específico (Fig. 27B). Un ligero incremento en la cantidad de p53 unido a p300 se puede observar tras sobre-expresión de VRK1 indicando un aumento en la formación del complejo p53-p300. Por lo que VRK1 parece ayudar en la coactivación de p53 por parte de p300.

2.9. VRK1 promueve la fosforilación y acetilación de p53 endógeno

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión de VRK1 sobre p53 endógeno usamos las líneas celulares A549 y MCF-7, con niveles de p53 silvestre suficientemente altos. Tras cotransfección con un plásmido de expresión de VRK1, no pudimos detectar una acumulación de p53 a los niveles que se observan con la proteína exógenamente introducida (Fig. 28A).

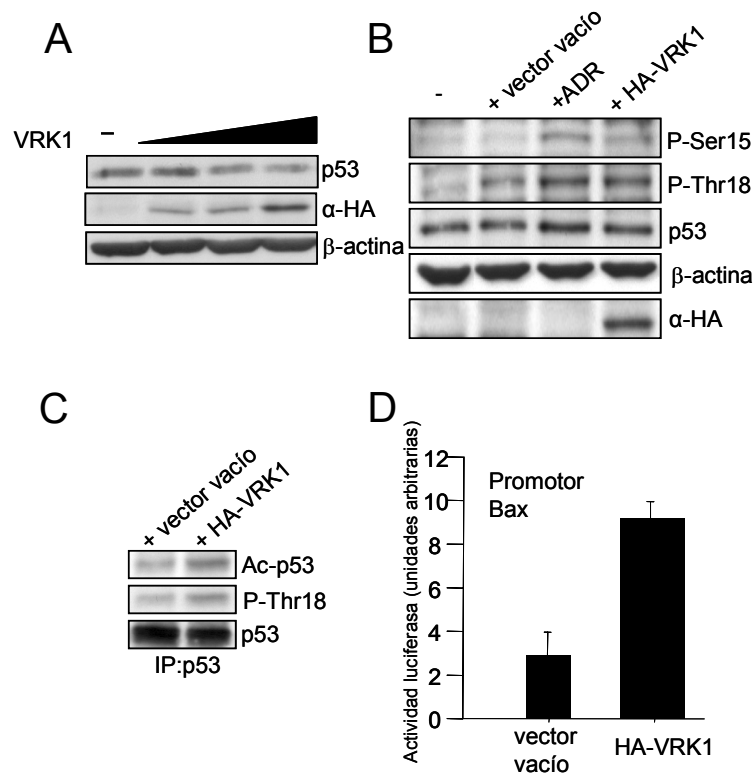


Figura 28. Efecto de la sobre-expresión de VRK1 sobre p53 endógeno. **A)** En la línea celular MCF-7 se sobre-expresó una forma de VRK1 con epítipo HA en cantidades crecientes. Tras 36 h de la transfección los lisados se procesaron para "Western blot" con los anticuerpos indicados. **B)** Células A549 se transfectaron con HA-VRK1 o se trataron con adriamicina. Se detectó tanto el p53 total como la fracción fosforilada en treonina 18 o serina 20. **C)** De extractos de A se inmunoprecipitó el p53 total y se detectó fosforilación en treonina 18 y acetilación de p53. **D)** En la línea celular A549 se introdujo el plásmido de respuesta a p53 derivado del promotor del gen Bax con o sin HA-VRK1. Se midió y representó la actividad luciferasa asociada en cada caso.

Probablemente el estado de p53 endógeno no haga posible ver el efecto de inducción por parte de VRK1 que se observa con p53 exógeno, que es sintetizado de novo y a niveles que mimetizan un estrés inicial, siendo localizada directamente en el núcleo sin necesidad de traslocación desde el citoplasma. Además los altos niveles de p53 endógeno hacen técnicamente complicado ver ese efecto con esta aproximación, puesto que todas las células expresan p53 pero no todas expresan la VRK1 exógena. Es por ello que decidimos mirar si había algún cambio en el estado de fosforilación de p53 tras sobre-expresión de la quinasa. Para ello sobre-expresamos VRK1 en estas células y realizamos “Western blot” con los extractos celulares obtenidos para detectar fosforilación en treonina 18 y serina 15 de p53 usando anticuerpos específicos (Fig.28B). Observamos un incremento en la fosforilación de treonina 18 mayor que el que se obtiene solamente por el método de transfección con lipofectamina, que induce de por si una respuesta similar al estrés en células humanas (Saito et al., 2003). Este incremento es similar al obtenido cuando sometemos a las células a tratamiento con el agente causante de daño en el ADN adriamicina a 0.2µg/ml. También analizamos el grado de acetilación de p53 en los residuos lisina 373 y 382, observando un incremento de esta tras transfección con el plásmido de VRK1 (Fig. 28C). Se puede observar también un ligero aumento de la fosforilación en serina 15.

Este incremento en la fosforilación de treonina 18 no es suficiente para acumular p53 a niveles detectables por “Western blot”, pero se ha descrito que la fosforilación en este residuo incrementa la actividad transcripcional dependiente de p53 (Dumaz and Meek, 1999; Jabbur et al., 2002). Para detectar una activación de p53 de forma indirecta, usamos una construcción con el promotor de respuesta a p53 del gen Bax acoplado a luciferasa y lo transfectamos en la línea A549 junto con VRK1 (Fig.28D). Pudimos comprobar un aumento de la transcripción dependiente de p53 tras la sobre-expresión de VRK1 incluso sin un incremento detectable en los niveles de la proteína p53 total, probablemente causados por un aumento en la fosforilación y acetilación del p53 endógeno.

3. VRK1 y su papel en tumorigénesis

3.1. La sobre-expresión de VRK1 no tiene fenotipo de supresión tumoral dependiente de p53

El efecto positivo de VRK1 con respecto a p53 y la consiguiente activación de la actividad transactivadora dependiente de este podría significar que la activación de VRK1 tendría un fenotipo de inducción de apoptosis o parada de ciclo celular dependiente de p53. Puesto que no conocemos el estímulo inductor de la actividad de VRK1, realizamos experimentos de sobre-expresión en línea celular con p53 endógeno.

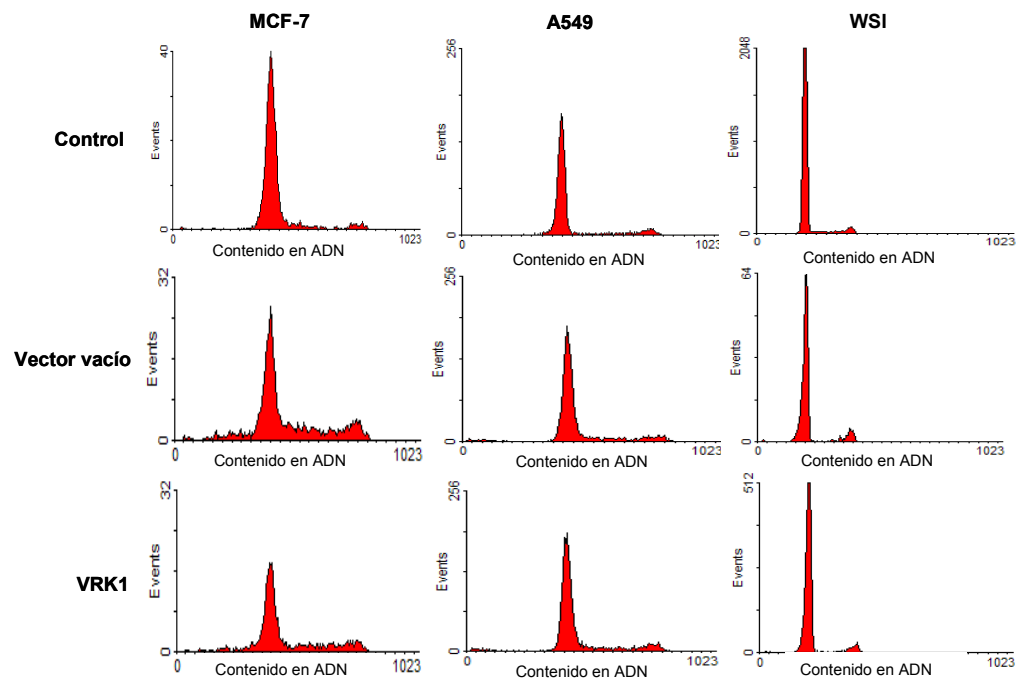


Figura 29. Perfil de ciclo en células con VRK1 sobre-expresada. Perfil de ciclo según tinción con yoduro de propidio de las líneas celulares indicadas sobre-expresando HA-VRK1 y seleccionadas por FACS.

Sobre-expresamos la quinasa VRK1 tanto en líneas celulares tumorales (MCF-7 y A549) como en fibroblastos humanos normales (WSI) y observamos por citometría de flujo el perfil de ciclo de las células positivamente transfectadas para poder detectar los mencionados cambios (Fig. 29). La sobre-expresión de

VRK1 no parece tener fenotipo claro de parada de ciclo o aumento de la apoptosis. Ningún fenotipo aparente con respecto al ciclo celular es detectado en las condiciones experimentales usadas de sobre-expresión transitoria en estas líneas celulares.

3.2. VRK1 no actúa como un supresor de tumores per se

Al tener VRK1 un efecto activador sobre el supresor de tumores p53, podría pensarse que VRK1 pudiera tener un efecto supresor de la formación de tumores por oncogenes de manera indirecta, actuando sobre p53. Para comprobar esta posibilidad se realizaron ensayos clásicos de formación de focos transformantes en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH/3T3 (Fig. 30).

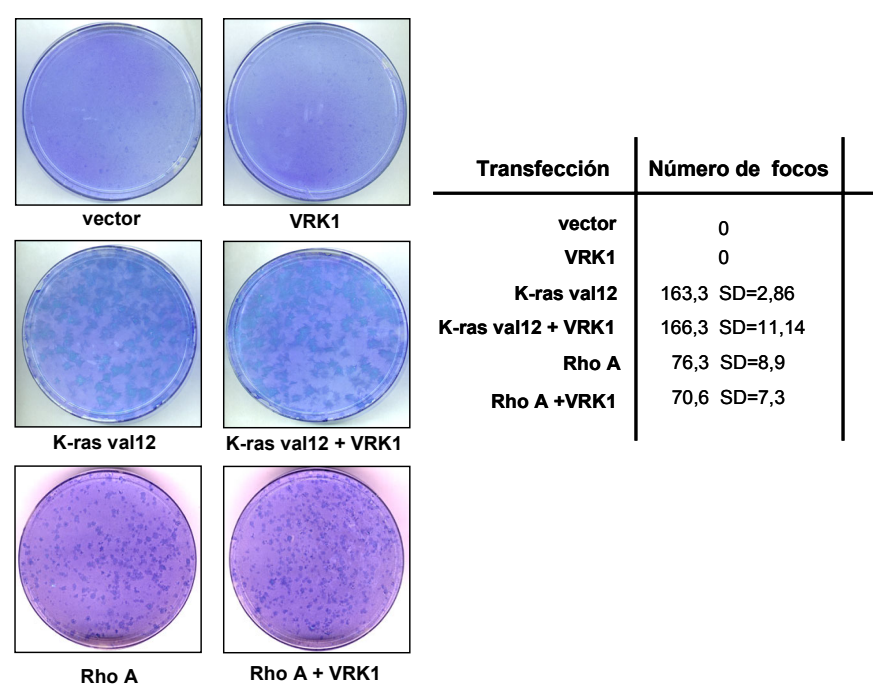


Figura 30. VRK1 no actúa como supresor de tumores per se. Ensayo de focos transformantes en NIH/3T3 con las proteínas oncogénicas indicadas con y sin VRK1. Se muestran los resultados promedio en tabla adjunta. SD: desviación estándar.

Se indujo la formación de focos transformantes mediante la sobre-expresión de la proteína oncogénica k-ras mutada en el residuo valina 12, o bien RhoA con la mutación Q63L, que los hacen constitutivamente activos. La sobre-expresión de la primera tiene efectos sobre la transformación de las células muy severos mientras que el potencial transformador de la última no es tan drástico. En ambos casos VRK1 se mostró incapaz de suprimir el efecto transformador provocado por la sobre-expresión de las proteínas oncogénicas, visualizado en la aparición de focos transformantes por μg de ADN al cabo de 2-3 semanas. Por tanto la sobre-expresión de VRK1 no parece tener actividad supresora de tumores *per se*.

3.3 La supresión de la expresión de VRK1 por RNAi genera un fenotipo de anormalidades en proliferación

Nada es conocido hasta ahora sobre la función fisiológica normal de VRK1 en la célula. Los experimentos de sobre-expresión de VRK1 no muestran ningún fenotipo característico. Es por ello que nos decidimos a suprimir la expresión de VRK1 endógena en distintas líneas celulares mediante RNAi específicos. Para ello introdujimos de forma transitoria en las células duplex de oligonucleótidos específicos para VRK1 o bien sus correspondientes duplex control no específicos. También usamos duplex RNAi para laminina A/C marcados fluorescentemente para medir eficiencia de transfección y supresión. Usamos 4 duplexes distintos para VRK1 y comprobamos que todos tenían capacidad de suprimir específicamente la expresión de VRK1 endógena con una eficiencia de en torno al 80% tanto en la proteína detectada por “Western blot” como en inmunofluorescencia (Fig. 31A). Esta supresión era observada desde las 39 h postransfección hasta las 72 h sin pérdida aparente de eficiencia. Para detectar algún fenotipo en las células con la expresión de VRK1 suprimida realizamos video-microscopía “time-lapse” de las células transfectadas con el siRNA específico para VRK1 o un control sin diana en células humanas (Fig. 31B).

Las células con la expresión de VRK1 reducida presentan diversas anomalías en proliferación que van desde un alargamiento de la mitosis, colapso y muerte celular sin llegar a completarla o muerte prematura de alguna de las células hijas tras la división celular. Otras células, presumiblemente las no transfectadas, se dividen normalmente.

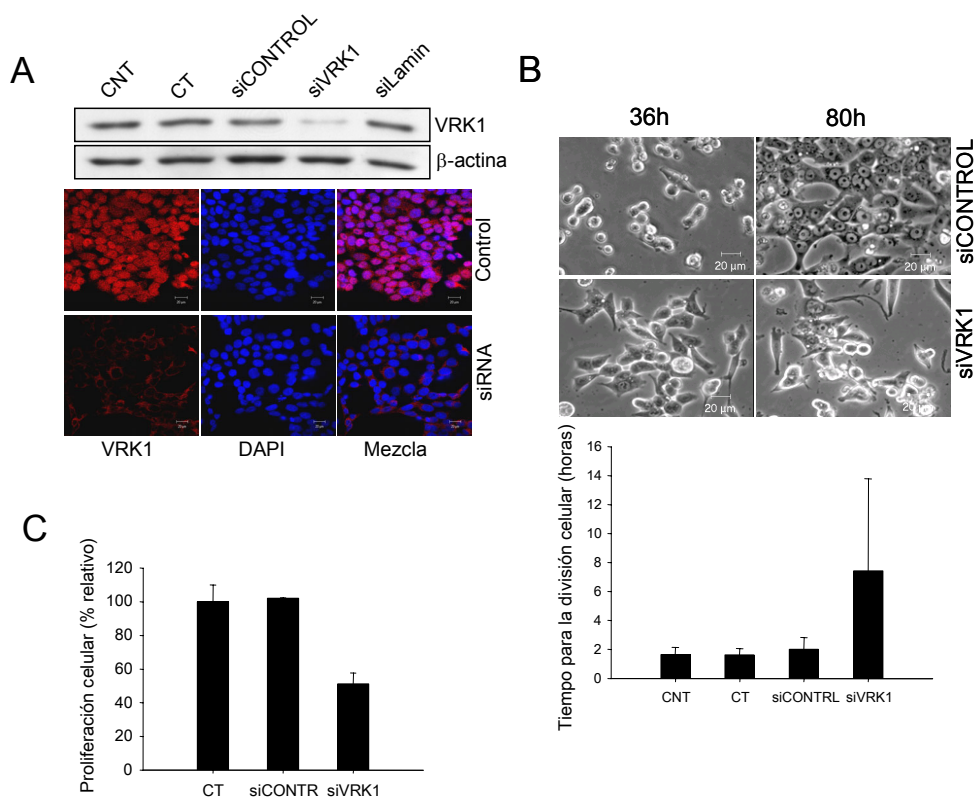


Figura 31. Efecto de la supresión de VRK1 por RNAi específicos en la línea celular HCT116. A) “Western blot” e inmunofluorescencia mostrando la supresión específica de la expresión de VRK1. **B)** Imágenes representativas de “time-lapse” a los tiempos indicados y representación de la duración de la división celular como una media de 30-40 células de diferentes experimentos. **C)** Cuantificación de la viabilidad y proliferación celular determinada por ensayo colorimétrico basado en el reactivo XTT. CNT: control no transfectadas; CT: control transfectadas sin RNAi; siCONTROL: RNAi sin diana humana; siLamin: RNAi específico para laminina A/C.

El resultado es visible en una menor confluencia de las células en cultivo comparadas con las células tratadas con el control en el mismo tiempo. Medimos la tasa de proliferación en estas células y resulta ser sensiblemente menor que

en el control por lo que parece ser que VRK1 podría estar implicada de algún modo en el control de la proliferación celular (Fig. 31C). Medimos los niveles de la quinasa mitótica cdc2 y de la ciclina B1, además de los de p53, por si se podían ver afectados por la supresión de la expresión de VRK1 (Fig. 32). Los niveles aparecen en todos los casos similares a los controles con expresión normal de VRK1.

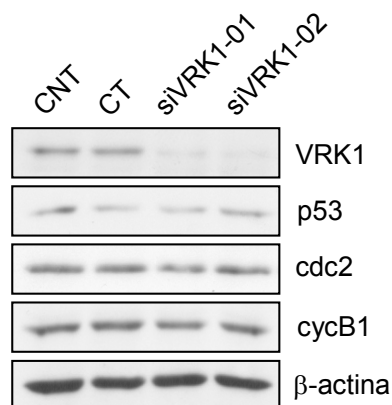


Figura 32. Niveles de proteínas mitóticas tras supresión de la expresión de VRK1 por RNAi. "Western blot" de extractos de células HCT116 transfectadas con 2 RNAi específicos diferentes para VRK1. CNT: control no transfectadas; CT: control transfectadas sin RNAi

4. La regulación de la actividad de VRK1

4.1. La expresión de VRK1 no se ve afectada por activadores de p53.

p53 es estabilizado y activado en respuesta a multitud de agentes causantes de diversos estreses. Uno de los más típicos y estudiados es el daño al ADN. Si VRK1 está implicado en la estabilización de p53 en respuesta a estos agentes, debería sufrir una activación previa manifestada por un cambio en los niveles o actividad de la proteína. Para estudiar la posible implicación de cambios en la expresión de la quinasa, medimos la expresión proteica de VRK1 tras la adición de agentes que provocan la acumulación y activación de p53. Entre ellos usamos algunos en los que se ha descrito la participación de otras fosforilaciones amino terminales de p53 distintas a la de serina 15, y entre las que podría estar la fosforilación en treonina 18. En concreto un agente típico causante de daños

en el ADN como la radiación ultravioleta a dosis baja (20J/m^2) y alta (50J/m^2) puesto que se ha descrito una respuesta de p53 diferente según la dosis (Latonen et al., 2001), y actinomicina D, agente causante de una parada de la transcripción (Ashcroft et al., 2000) (Fig. 33). A pesar de obtener una activación de p53 bastante buena a las dosis usadas, no detectamos cambios apreciables en los niveles de VRK1, por lo que si VRK1 está involucrada en la activación de p53 en respuesta a estos agentes, la regulación de su activación debe hacerse por cambios en la actividad de la quinasa y no en los niveles de expresión.

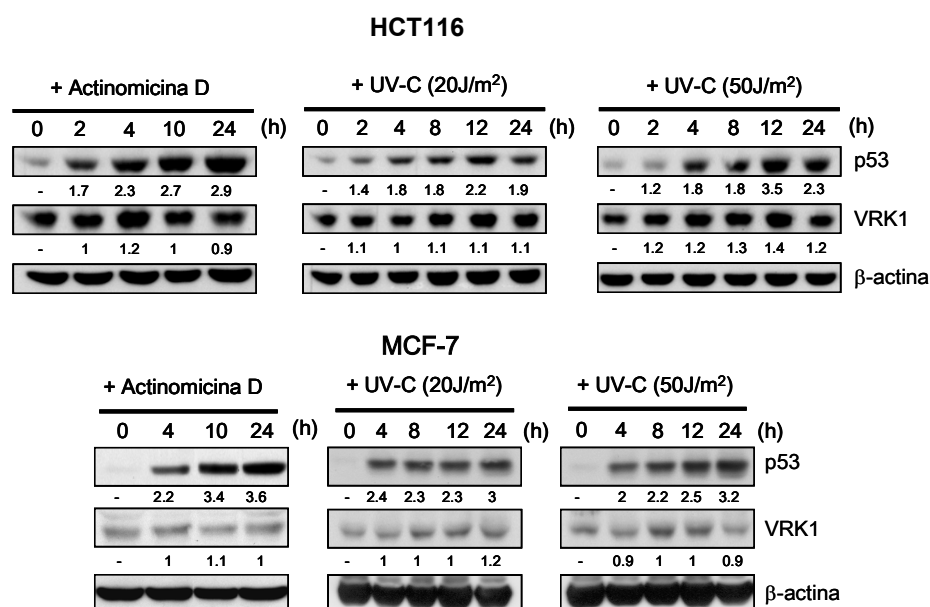


Figura 33. Expresión de VRK1 en respuesta a agentes activadores de p53. “Western blot” para detectar la expresión de p53, VRK1 y β -actina como control de carga tras los tratamientos y los tiempos indicados en cada caso. Se muestran los resultados en las líneas celulares HCT116 y MCF-7. Los “blots” se cuantificaron con respecto al control. Se indica el incremento en número de veces con respecto al tiempo 0.

4.2. La actividad quinasa de VRK1 es esencial para su estabilidad proteica

Para medir la estabilidad de la proteína VRK1 endógena tratamos a la línea celular Hela con cicloheximida, un inhibidor de la transcripción, y tomamos muestras antes del tratamiento y a diferentes puntos tras la adición de la droga

(Fig. 34A). La cantidad de proteína VRK1 detectada mediante “Western blot” de extractos celulares en tampón RIPA con un anticuerpo específico no varió sensiblemente durante las 10 horas del tratamiento. Como control, p53 desaparece a tiempos muy tempranos como consecuencia de su corta vida media. A partir de las 10 horas se empieza a detectar de nuevo p53, lo que indica que el tratamiento deja de tener efecto a esas concentraciones.

Ya anteriormente habíamos observado la menor expresión del mutante inactivo de VRK1, VRK1-K179E, cuando se sobre-expresaba en células con igual cantidad de ADN y el mismo vector de expresión que para la proteína silvestre. Medimos la estabilidad de la proteína VRK1 mutante inactiva comparada con la silvestre en un experimento similar al anterior con cicloheximida pero detectando proteína transfectada en la línea celular 293-T, en la que se obtienen niveles muy altos de transfección (Fig. 34B)

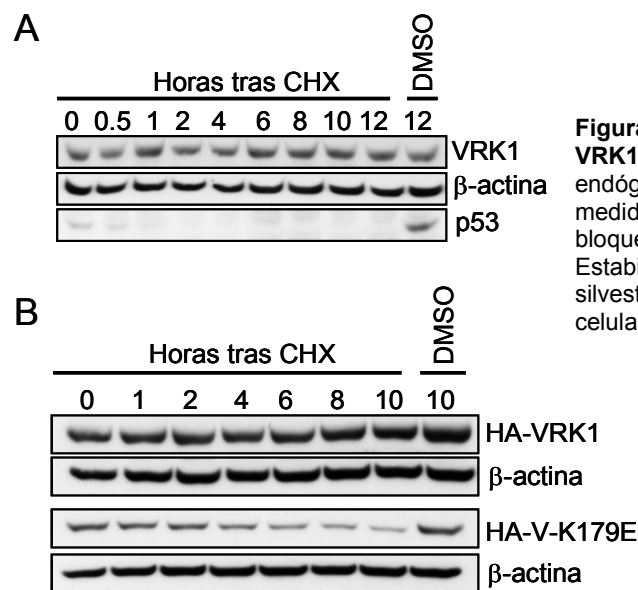


Figura 34. Estabilidad proteica de VRK1. **A)** Estabilidad de VRK1 endógena en la línea celular HeLa medida por “Western blot” tras bloqueo con cicloheximida. **B)** Estabilidad de VRK1 exógena silvestre y mutante en la línea celular 293-T medida como en A.

Efectivamente la vida media de la proteína VRK1 quinasa inactiva es sensiblemente menor que la de la silvestre, observándose un descenso pronunciado de la detección en ausencia de transcripción a partir de las 3 horas.

Este resultado nos indica que la actividad quinasa de VRK1, única diferencia sustancial entre las dos proteínas, tiene un papel en la estabilidad de la propia proteína, probablemente por la ausencia de auto-fosforilación o por la fosforilación de algún regulador, desconocido hasta el momento.

4.3. La auto-fosforilación de VRK1 no afecta a su actividad enzimática *in vitro*

VRK1 muestra una alta actividad auto-fosforiladora en varios residuos de serina y treonina sin que por el momento se haya dilucidado el papel de esta fosforilación. Varias quinasas regulan su actividad mediante fosforilación. Decidimos ver si la actividad enzimática de VRK1 se veía afectada por esta auto-fosforilación *in vitro*. Para ello incubamos la proteína de fusión con GST de VRK1 con altas concentraciones de ATP durante toda la noche con la intención de provocar una intensa auto-fosforilación. Después se lavó el ATP no unido covalentemente a la proteína y se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* con ATP radiactivo y p53 como sustrato tal como se describe anteriormente (Fig. 35).

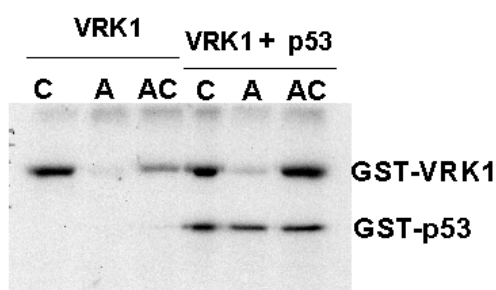


Figura 35. Efecto de la auto-fosforilación en la actividad de VRK1. C: Reacción de auto-fosforilación control. A: reacción de auto-fosforilación con exceso de ATP frío durante toda la noche y posterior ensayo quinasa con ATP radiactivo sola o sobre p53. AC: reacción como en A pero sin ATP como control del proceso.

4.4. La sobre-expresión de p53 regula negativamente la expresión de VRK1 exógeno

En los experimentos de cotransfección con p53 y VRK1 en la línea celular H1299 realizamos la observación de que al sobre-expresar p53 se producía un caída en los niveles de expresión del VRK1 exógenamente expresado. Esa bajada parece ser específica y dependiente de la cantidad de p53 (Fig. 36A) y se

produce de igual forma con la inducción de p53 por tetraciclina en una línea H1299 modificada que tiene al promotor de p53 bajo la expresión de este antibiótico (Fig. 36B). No se produce sin embargo bajo estas condiciones en la proteína VRK1 endógena (Fig. 36C).

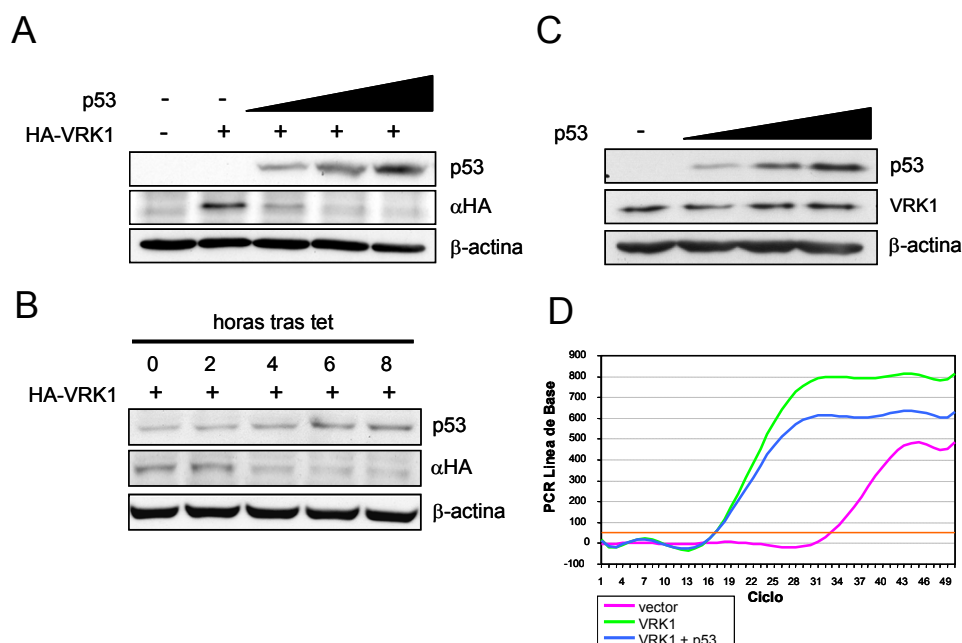


Figura 36. Regulación de los niveles de VRK1 por p53. A) Sobre-expresión de p53 en cantidades crecientes y HA-VRK1 en una cantidad fija en la línea celular H1299 y detección con anticuerpos específicos mediante “Western blot”. B) Sobre-expresión de HA-VRK1 en la línea celular H1299 con p53 inducible con tetraciclina (2μg/ml) y detección de los niveles de p53 y HA-VRK1 a los tiempos indicados tras la inducción. C) Efecto de la sobre-expresión de p53 sobre VRK1 endógena en la línea H1299. D) Representación gráfica de RT-PCR cuantitativa mostrando los niveles de ARNm de VRK1 en presencia o ausencia de p53 sobre-expresado.

Se han descrito bucles de regulación negativa entre p53 y algunos de sus reguladores. Este tipo de regulación permite que la activación de p53 sea transitoria. El más conocido es el de Mdm2-p53. Podría existir un bucle regulatorio similar entre VRK1 y p53 y por ello realizamos una serie de experimentos. Estudiamos primero si esta regulación negativa de p53 sobre VRK1 podía ser un fenómeno transcripcional sobre el gen de VRK1. Para ello realizamos RT-PCR cuantitativa en tiempo real para ver la expresión de VRK1 en

Si el efecto es postranscripcional el candidato obvio era Mdm2 puesto que es activado por p53 y cataliza la ubiquitinación de distintas proteínas provocando su degradación (Fig. 37A). En presencia de Mdm2 sobre-expresado, el efecto de p53 sobre VRK1 se ve reducido, aunque parece ser mayormente consecuencia de la degradación de p53 y no de un efecto directo sobre VRK1, ya que la regulación negativa se observa de igual forma en la línea celular derivada del doble KO de Mdm2 y p53, que no tiene ninguna expresión de Mdm2 (Fig. 37B). Al realizar el experimento en presencia del inhibidor del proteosoma MG132 tampoco se observa una reducción significativa de la supresión de la expresión de VRK1 por p53, por lo que el efecto no parece ser mediado por una reducción en la estabilidad de la proteína por degradación en el proteosoma.



5. El grupo de quinasas VRK en el ratón

De los tres miembros de la familia de kinasas VRK conocidos en humanos sólo VRK1 había sido caracterizado en ratón (Zelko et al., 1998).

Nosotros identificamos a los otros dos miembros por homología con el correspondiente ADNc humano. El alineamiento mediante el programa *ClustalW* de las secuencias de proteína predichas se puede observar en la figura 38 (Fig. 38).

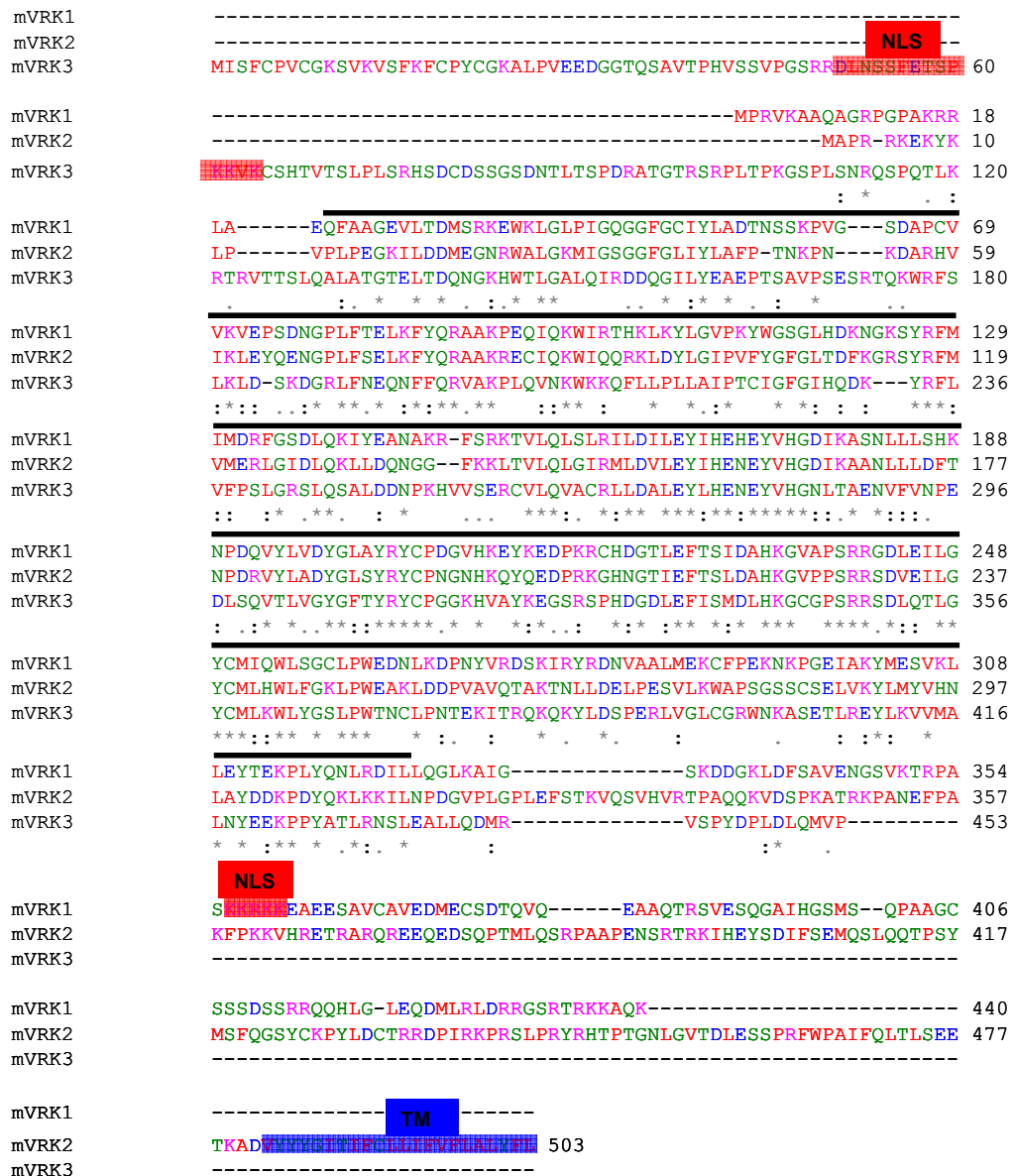


Figura 38. Alineamiento de las tres VRK quinasas de ratón. Alineamiento de las secuencias de proteína derivadas del ADNc con el programa “Clustal W”. Con una barra negra se muestra la región con el dominio serina-treonina quinasa conservado. NLS: señal de localización nuclear. TM: región trans-membrana.

Las tres proteínas tienen una homología del 73% en su dominio catalítico serina/treonina quinasa pero, a diferencia de VRK1 y 2, VRK3 tiene su dominio catalítico en el extremo carboxi-terminal de la molécula. Tanto VRK1 como VRK3 poseen una secuencia de localización nuclear, pero la localización de VRK3 *in vivo* aun no es conocida. VRK2 posee una región hidrofóbica de anclaje a membrana al final de su extremo carboxi-terminal que podría influir en su localización, desconocida por el momento. Tanto el extremo carboxi-terminal de VRK1 y VRK2 como el amino terminal de VRK3 carecen de homología con cualquier otra proteína o dominio conocido hasta ahora.

5.2. Expresión de proteínas de la familia VRK durante el desarrollo hematopoyético murino

Desde la identificación de la familia de quinastas VRK se había propuesto a estas proteínas como posiblemente involucradas en fenómenos de proliferación y división celular. Nos propusimos analizar la expresión de las diferentes quinastas de la familia durante un evento con alta tasa de proliferación celular como es el desarrollo hematopoyético del ratón. Para ello amplificamos por PCR los ADNc procedentes de los ARN específicos de VRK1, 2 y 3 a partir de muestras de ARN total extraído de diferentes órganos de embriones de ratón en diferentes estadios de desarrollo (Fig. 39).

Se analizaron los niveles de expresión de VRK en el hígado fetal. Durante el desarrollo embrionario este órgano sufre un incremento significativo en número y tamaño de células y diversos precursores hematopoyéticos son liberados desde él desde el día 13.5 del desarrollo. Los tres genes VRK son expresados durante todo el desarrollo del hígado fetal, con máximos entre los días 11 y 14. El nivel de expresión de VRK2 es menor que el de VRK1 y VRK3 que alcanza su máximo los mismos días.

En el caso de tejidos hematopoyéticos embrionarios, los tres genes parecen estar expresados durante todo el periodo, aunque VRK2 a un nivel muy inferior (unas 10 veces) al de VRK1 y VRK3. En el caso de sangre periférica se

alcanza un máximo de expresión entre los días 10.5 y 11.5 para caer luego, mientras que los niveles de expresión en bazo o timo son más constantes (Fig. 39B y C).

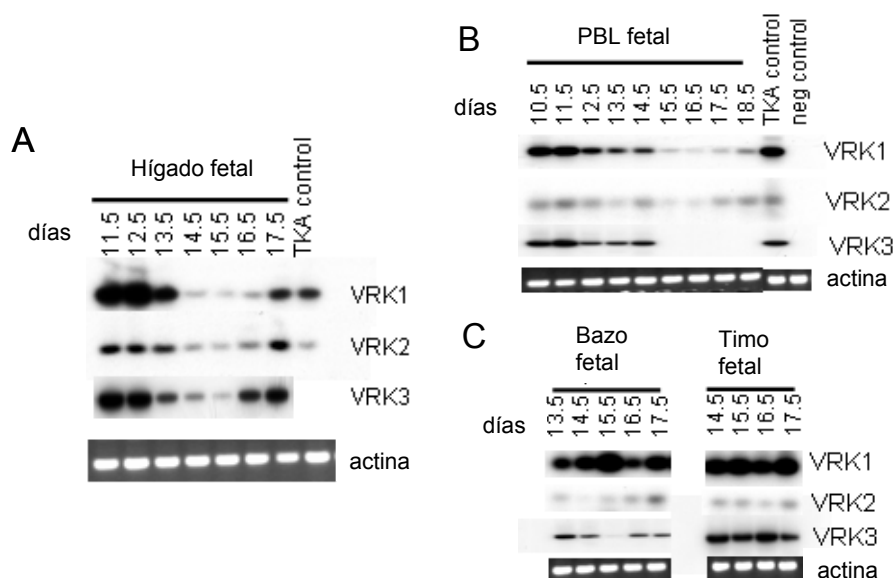
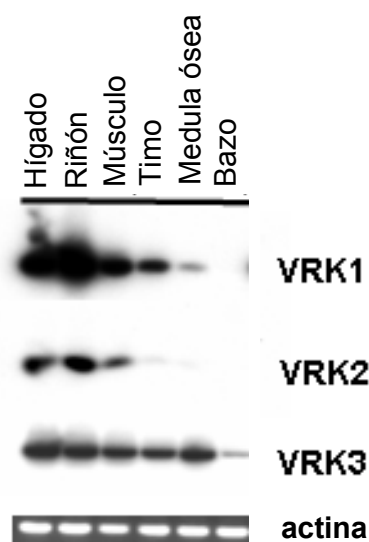


Figura 39. Expresión de ARNm de los genes VRK en el desarrollo hematopoyético del ratón. A) Expresión en el hígado fetal. **B)** Expresión en sangre periférica de cordón umbilical (PBL) de ratón. **C)** Expresión en bazo y timo fetal. En todos los casos la cantidad de VRK3 cargada en el gel es un décimo de la de VRK1 y VRK2.

Por último se analizó la expresión de los tres genes en tejidos adultos de ratón (Fig. 40). La expresión de VRK1 y VRK2 es dependiente del tejido celular analizado siendo alta en hígado, riñón y músculo y baja en los tejidos hematopoyéticos adultos analizados (timo, bazo y medula ósea), mientras que VRK3 muestra una expresión más constante en todos los tejidos. La expresión de VRK1 en estos tejidos concuerda con la descrita anteriormente con la proteína bajo la denominación de 51PK (Zelko et al., 1998).

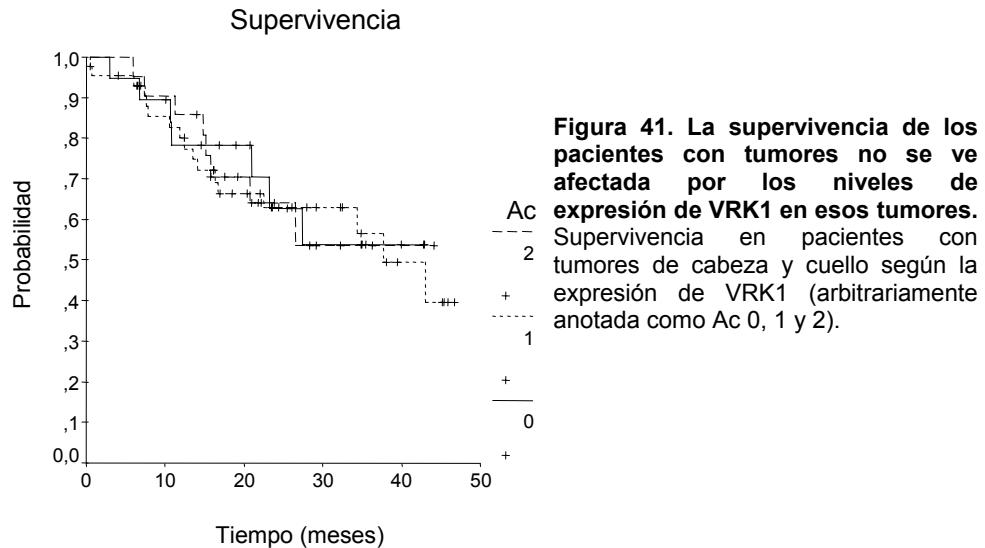
Figura 40. Expresión de los genes VRK de ratón en tejidos adultos. RT-PCR mostrando la expresión de los distintos ARN mensajeros en los tejidos adultos señalados.



6. VRK1 en cáncer de cabeza y cuello

Desde el principio se postulo la implicación de VRK1 en procesos de control de la proliferación celular por su homología con la quinasa viral B1R y por los datos previos de los experimentos realizados con sus homólogos en levaduras o *C. elegans* (Boyle and Traktman, 2004; Dhillon and Hoekstra, 1994; Kamath et al., 2003; Nezu et al., 1997; Simmer et al., 2003).

Para dilucidar la posible implicación de VRK1 en procesos de tumorigénesis *in vivo* realizamos inmunohistoquímica en una colección de 86 casos de tumores de cabeza y cuello para detectar el nivel de expresión de la proteína VRK1, p53 y otros marcadores tumorales. Lo primero que observamos es que los niveles de VRK1 varían de unos tumores a otros. La supervivencia de los pacientes sin embargo, no varía en atención a la expresión de VRK1 (Fig. 41), por lo que los niveles de VRK1 no tendrían relevancia, en principio, para la malignidad del tumor.



RESULTADOS

Se pudo observar cierta correlación entre los niveles de VRK1 y los de p53 y genes de respuesta a p53, siendo esta estadísticamente significativa en el caso de Mdm2 pero no en el de p53, posiblemente por la existencia de casos no discriminados con mutaciones en p53 (Fig. 42). Tampoco en el caso de p21.

También se obtuvieron correlaciones significativas entre la expresión de VRK1 y otros marcadores, que mayoritariamente tienen que ver con proliferación o regulación del ciclo celular (Fig. 42-Tabla). Entre el marcador de proliferación Ki-67, la survivina o las proteínas implicadas en división celular CDK2, CDC2 o RB en su estado fosforilado.

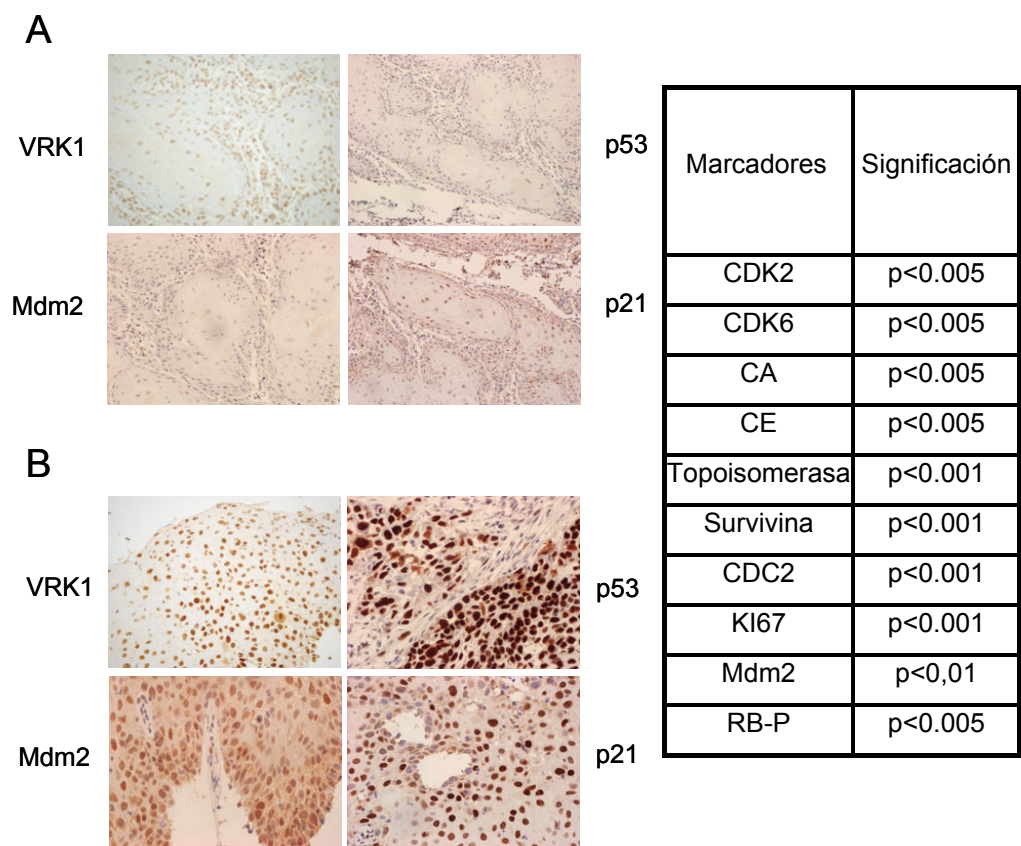


Figura 42. La expresión de VRK1 correlaciona en algunos tumores con la expresión de p53 y genes de respuesta a p53. A) Tumor de cabeza y cuello con bajos niveles de VRK1, p53, Mdm2 y p21. **B)** Tumor de cabeza y cuello con altos niveles de VRK1, p53, Mdm2 y p21. **Tabla)** Marcadores cuya expresión correlaciona positivamente con la expresión de VRK1 y la significación estadística de la correlación según test Chi-cuadrado de contingencia.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La quinasa endógena. Expresión y localización

La quinasa VRK1 fue inicialmente descrita como expresada en multitud de tejidos con alta capacidad proliferativa y en varias líneas celulares tumorales humanas, mediante la detección de su ARN mensajero (Nezu et al., 1997). Nosotros hemos comprobado además la expresión de la proteína VRK1 usando anticuerpos específicos para su detección. Se ha detectado la expresión relativamente abundante de VRK1 en todas las líneas celulares tumorales probadas, procedentes de tejidos como cervix, mama, riñón, colon, hueso, pulmón, hígado, y en células sanguíneas. También hemos constatado su presencia en fibroblastos humanos normales procedentes de piel y pulmón. Hasta el momento no podemos describir ninguna línea celular en la que no se detecte VRK1, por lo que su expresión parece ser ubicua en todos los tipos celulares. Sin embargo en tejidos humanos si hemos detectado una expresión variable, siendo casi indetectable por inmunohistoquímica en algunos casos y correlacionando su mayor expresión con tejido tumoral o proliferativo. Por lo tanto no descartamos que la presencia ubicua de niveles apreciables de VRK1 en líneas celulares se deba a la naturaleza inmortal o casi inmortal de estas.

Pudiera ser que VRK1 se encontrara expresada mayoritariamente en células en división, con una presencia diferencial en las distintas fases del ciclo celular. El que se haya descrito como posible diana transcripcional del factor de transcripción E2F podría argumentar a favor de esta idea (Vernell et al., 2003). Sin embargo, al medir la expresión de la proteína VRK1 durante el ciclo celular mediante doble marcaje en citometría de flujo para VRK1 y ADN en cultivo asincrónico, encontramos que los niveles de VRK1 son muy similares y relativamente altos en todas las fases del ciclo. Más aun, por inmunofluorescencia detectamos expresión nuclear de VRK1 durante interfase, como corresponde a una proteína con una señal de localización nuclear activa, pero dispersa por toda la célula en mitosis, sin ninguna asociación aparente con el ADN o los husos mitóticos. Una vez que la envuelta nuclear vuelve a

reorganizarse en telofase, antes de la citocinesis, la proteína se localiza de nuevo rápidamente en el núcleo.

Mayoritariamente la proteína se ha encontrado localizada, tanto en inmunofluorescencia como por fraccionamiento celular, en el núcleo pero excluida del nucleolo. Sin embargo en algunos casos se ha encontrado su acumulación en el nucleolo sin que sepamos por el momento a que responde esta localización diferencial en una población minoritaria. No se ha detectado en la proteína ninguna señal consenso de localización nucleolar. Se ha descrito la traslocación dentro y fuera del nucleolo para diversas proteínas, con un papel en la regulación de su actividad, como por ejemplo para Mdm2 y p14^{ARF} (Lloyd, 2000). La localización de VRK1 dentro y fuera del nucleolo también podría estar regulada y ser un mecanismo a través del cual la quinasa interaccione con sus sustratos, pero serán necesarios nuevos datos para dilucidar este extremo.

VRK1 y p53

Estudios anteriores en el laboratorio del profesor Pedro Lazo identificaron a p53 como sustrato *in vitro* de VRK1. VRK1 cataliza la fosforilación de p53 específicamente en el residuo treonina 18 (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Hemos realizado experimentos para seguir caracterizando esta fosforilación, encontrando que la K_m de la reacción es de 1 μ M usando de forma independiente dos construcciones de la región amino terminal de p53 diferentes. Las características bioquímicas de VRK1 en cuanto a la alta afinidad por el donador de fosfato y de cationes divalentes (50 μ M para el ATP y 2,8mM para el magnesio) indican que, a las concentraciones intracelulares de estos elementos, la enzima debería ser funcional a su máximo rendimiento y su actividad no se vería limitada por la concentración de nucleótidos, siendo el factor limitante la concentración intracelular de sus sustratos específicos (Barcia et al., 2002). La K_m de la reacción de fosforilación de p53 por VRK1 correspondería bien con una

fosforilación de este sustrato *in vivo* cuando las concentraciones intracelulares varían, como es el caso ante la respuesta a estrés (Barcia et al., 2002).

El residuo treonina 18 en p53 está ampliamente conservado entre especies y se ha descrito como esencial para el mantenimiento de la interacción entre p53 y su regulador negativo Mdm2 (Jabbur et al., 2002; Kussie et al., 1996; Schon et al., 2002). Tal como se ha comentado, modificaciones en este residuo tales como fosforilación o mutación a alanina impiden la formación de un puente de hidrógeno entre la treonina 18 y la asparagina en posición 21. Este puente de hidrógeno es esencial para el mantenimiento de la estructura en α -hélice de p53 en esta región, que posibilita su interacción estable con el bolsillo hidrofóbico que se forma en la región amino terminal de Mdm2. Se ha postulado por ello que la fosforilación en este residuo en respuesta a estrés podría regular la estabilidad de p53 mediante la interrupción de su interacción con Mdm2. La sola fosforilación *in vitro* de p53 en treonina 18 por VRK1 provoca este efecto de la misma forma que lo hace la mutación a alanina en esta posición corroborando la hipótesis. Un mecanismo similar se ha descrito para la fosforilación de p53 por la CKI- δ (Dumaz et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000). Sin embargo en este caso la enzima requiere la previa fosforilación en serina 15 para fosforilar en treonina 18, una propiedad típica de las caseína quinasas (Flotow et al., 1990). VRK1 no necesita ninguna fosforilación previa en p53 para fosforilar en treonina 18 y es por eso que pensamos que pueda tener un mecanismo de acción distinto sobre p53 *in vivo*. VRK1 además no fosforila a Mdm2 en la parte amino terminal, responsable de su unión a p53, por lo que todo efecto sobre la interacción p53-Mdm2 se debe a la acción de la quinasa sobre p53.

En la línea celular H1299, la sobre-expresión de VRK1 provoca un incremento en los niveles de equilibrio de p53 exógenamente expresado, dependiente de la cantidad de VRK1 introducida y de la actividad fosforiladora de la enzima, ya que el efecto se ve abolido cuando la proteína introducida es una

VRK1 con una mutación puntual en la lisina 179, esencial para la actividad enzimática. La actividad de p53 es principalmente regulada por diferencias en su estabilidad que provocan cambios rápidos y transitorios en la cantidad de proteína. VRK1 parece actuar sobre p53 aumentando la estabilidad de la proteína en un efecto postranscripcional, seguramente mediante una reducción en su tasa de degradación. La vida media de la proteína es de este modo aumentada y sus niveles de equilibrio incrementados resultando una acumulación de p53 detectable por diversas técnicas.

El p53 exógenamente expresado se localiza *per se* en el núcleo, posiblemente por un pseudo-estrés inicial provocado por la transfección. Allí comparte localización con VRK1 por lo que ambas proteínas se localizan en el mismo compartimento celular permitiéndose la interacción entre ellas. También es capaz de promover un nivel basal de transcripción medido por la acción sobre promotores de respuesta a p53 específicos acoplados al gen de la luciferasa. La acción de VRK1 acumula p53 en el núcleo y ese p53 acumulado es transcripcionalmente activo sobre diferentes promotores específicos. De entre todos los promotores probados no hemos detectado la activación diferencial de ninguno de ellos implicado en un tipo de respuesta concreta, ya sea parada de ciclo celular o apoptosis. Por lo tanto implicamos a VRK1 en una activación genérica inicial de p53, al menos en este sistema experimental.

El p53 acumulado es intensamente fosforilado en treonina 18 de una forma rápida. Dada la actividad de VRK1 y el estatus de fosforilación del p53 acumulado, presumiblemente la fosforilación de p53 por VRK1 podría ser la desencadenante de esta estabilización, aunque no descartamos un efecto indirecto por fosforilación de otros sustratos o por acción sobre reguladores de p53. De hecho VRK1 es capaz de provocar la acumulación de un mutante de p53 en el residuo treonina 18 a alanina, no fosforilable por VRK1. La proteína mutante p53T18A, aun siendo no fosforilable en este residuo, se ha descrito que mimetiza la fosforilación en cuanto a la interrupción de la interacción con Mdm2 ante la imposibilidad de formar el puente de hidrógeno con la asparagina 21 (Jabbur et

al., 2002; Schon et al., 2002). Se ha detectado un aumento en la actividad transcripcional de este mutante aunque no un aumento de su estabilidad intrínseca (Jabbur et al., 2002), indicando la presencia de otros mecanismos de degradación de p53, como la participación de otras ubiquitina-ligasas, en la degradación de este mutante, puesto que la degradación por Mdm2 está afectada. Esto podría explicar la estabilización de este mutante por parte de VRK1 mediante mecanismos independientes de Mdm2, que serían además los mismos que funcionarían en la línea celular nula para Mdm2. Tampoco podemos descartar totalmente la fosforilación de algún otro residuo en la región carboxilo terminal de p53 *in vivo*, aunque este extremo es poco probable ya que no se observa esa fosforilación *in vitro*. Algún cofactor podría ayudar *in vivo* en esa fosforilación aunque por el momento no tenemos evidencias experimentales para apoyar esta hipótesis.

El residuo treonina 18 y su fosforilación como elemento regulador de p53 ha recibido creciente atención en el estudio de la regulación de la actividad del supresor de tumores. Ha sido descrito como el único residuo en la región de interacción con Mdm2 capaz de regular la unión de p53 a este de una forma directa (Bottger et al., 1999; Jabbur et al., 2002; Sakaguchi et al., 2000; Schon et al., 2002). Su fosforilación también promueve la unión de p53 con coactivadores como p300 o TAF_{II}31 y aumenta la actividad transcripcional de p53 (Dornan and Hupp, 2001; Jabbur et al., 2002). Un mutante p53T18D con la sustitución a aspártico, mimética de fosforilación, tiene aumentada sus propiedades anti-proliferativas con respecto al p53 silvestre (Jabbur and Zhang, 2002). Recientemente se ha mostrado que la estabilización de p53 en respuesta a estrés puede ocurrir en ausencia de fosforilación en serina 15 o serina 20 (Jackson et al., 2004), sugiriendo que la fosforilación en otros residuos como el treonina 18, u otros mecanismos de estabilización, podrían jugar un papel más prominente que las fosforilaciones en serinas amino terminales clásicas, bajo ciertas circunstancias. La quinasa o quinasas responsables de la fosforilación de

p53 en treonina 18 han sido pobremente descritas. Como se ha mencionado, la CKI- δ necesita la fosforilación previa de serina 15 (Dumaz et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000), pero hay casos en los que esta fosforilación no se da en medida suficiente o no es necesaria para la estabilización de p53, y una cierta fosforilación de p53 en treonina 18 se puede observar ya en condiciones basales, sin estrés ni fosforilación en serina 15 previa. También se ha descrito la fosforilación de p53 en treonina 18 en respuesta a estrés por parte de la quinasa Chk2 (Craig et al., 2003), aunque también generalmente tras la fosforilación previa de serina 15. En nuestro sistema VRK1 se muestra como mejor activador de p53 que Chk2, que es incapaz de estabilizarlo tras sobre-expresión. Chk2 se activa por fosforilación previa, normalmente por la quinasa ATM tras irradiación ionizante (Appella and Anderson, 2001). Pudiera ser que VRK1 ejerciera su acción induciendo la fosforilación de p53 en treonina 18 por Chk2 en lugar de una fosforilación directa por VRK1, pero esta no tiene ningún efecto sobre Chk2 en cuanto a fosforilación. Tampoco Chk2 fosforila a VRK1. Además VRK1 ejerce su efecto sobre p53 incluso en presencia de una forma dominante negativa de Chk2, excluyendo alguna participación de la quinasa Chk2 en la activación de p53 por VRK1. Recientemente el papel de Chk2 en la activación de p53 ha sido discutido en trabajos que muestran una respuesta normal al daño al ADN en ciertas células tumorales, tras supresión de la quinasa. También otros discuten la importancia de la fosforilación de p53 en serina 20 para su regulación (Ahn et al., 2003; Wu et al., 2002). Sin embargo generalmente es aceptada la participación de esta quinasa en los mecanismos de respuesta a estrés, al menos en ciertos momentos. Chk2 y VRK1, junto con otras quinasas, podrían colaborar *in vivo* para la activación de p53 en determinadas circunstancias o actuar sobre p53 en distintos momentos aun incidiendo en mecanismos similares de activación como la fosforilación en treonina 18.

VRK1 también promueve la coactivación de p300 sobre p53 mediante la inducción de la formación del complejo estable p53-p300 y de la acetilación de

p53 en el dominio carboxilo terminal. Se había descrito previamente que la fosforilación de p53 en treonina 18 provocaba estos efectos en cuanto a la transactivación de p53 (Dornan and Hupp, 2001; Dornan et al., 2003a; Dornan et al., 2003b; Jabbur et al., 2002). La sobre-expresión de VRK1 podría desencadenar estos fenómenos promoviendo esa fosforilación. El aumento de la acción de p300 sobre p53 por VRK1 también explica la activación de la transcripción dependiente de p53 tras la sobre-expresión de VRK1. La sobre-expresión de Chk2, sin embargo, no es capaz de promover esa acetilación de p53 mostrándose de nuevo como peor activador de p53 que VRK1 en nuestro sistema. Ha sido un problema discutido y sin resolver en el campo de p53 el efecto predominante de la fosforilación de treonina 18 en p53: la inhibición de la acción de Mdm2, la estabilización de p300 o algún otro desconocido hasta el momento. Aunque en realidad ambos fenómenos van unidos por interaccionar los dos reguladores con la misma región de p53, en nuestro sistema la estabilización de p300 parece jugar un papel más importante que la inhibición de Mdm2 para la activación de p53.

VRK1 es capaz de inducir la estabilización de los mutantes de p53 en treonina 18, serina 15 y serina 20 a alanina, indicando que la eliminación de esas fosforilaciones por separado no son capaces de abolir el efecto de VRK1. VRK1 también estabiliza al doble mutante en serina 15 y serina 20. La acumulación de p53 por VRK1 solo se previene por mutación de treonina 18 en combinación con alguna otra. Dejando a parte el hecho de que la estabilidad intrínseca o propiedades de estas proteínas mutadas pueden estar afectadas y los resultados deben ser tomados con cautela, podría darse el caso de que VRK1 colaborara con otras proteínas para conseguir la fosforilación de las otras serinas amino-terminales y la activación de p53. Según esta hipótesis, cuando la treonina 18 es mutada, VRK1 aun ejerce su efecto promoviendo de alguna forma la fosforilación de las serinas y sólo cuando se mutan en combinación al menos la treonina 18 y la serina 15 o 20 se pierde la capacidad de estabilizar a p53. Si esto es así, las

quinasas candidatas a ser coactivadas por VRK1 serian varias de la familia de las PI3-K como son ATM, ATR y DNA-PK. A todas se las ha descrito como inductoras de la fosforilación de la serina 15 y 20 en p53, bien directamente, o a través de otras quinasas como Chk1 y Chk2. Sin embargo, en presencia de inhibidores conocidos de este grupo de quinasas como cafeína o wortmanina (Sarkaria et al., 1999), VRK1 sigue estabilizando tanto a p53 silvestre como al mutante en treonina 18 a alanina excluyendo la necesidad de estas quinasas en la estabilización de este mutante. De este modo, aunque *in vivo* la colaboración entre distintas quinasas y distintas fosforilaciones ocurra para provocar una activación completa de p53 o dotar de especificidad a la respuesta de p53 en distintas situaciones (Brooks and Gu, 2003; Saito et al., 2003; Webley et al., 2000), la activación de esas quinasas por VRK1 queda descartada como mecanismo mediante el cual VRK1 estabiliza a p53 en ausencia de una fosforilación directa en treonina 18.

En cuando a p53 endógeno, observamos un aumento en la fosforilación en treonina 18 y en la acetilación de p53 tras sobre-expresar la quinasa VRK1, aun sin detectar un aumento significativo en los niveles totales de p53 medidos por “Western blot”. También detectamos un incremento en la actividad transcripcional dependiente de p53, esperable puesto que la fosforilación en treonina 18 y la acetilación en carboxilo terminal de p53 han sido asociados con este fenómeno. El incremento en esa fosforilación es similar al encontrado cuando usamos adriamicina, un agente causante de daño en el ADN. Sin embargo los niveles o la actividad de VRK1 no se ven afectados por la adición de esta droga. El ligero incremento en la fosforilación en serina 15 detectada podría ser indicativo otra vez de un posible mecanismo cooperativo con otras quinasas para activar p53, puesto que ese residuo no es fosforilado directamente por VRK1.

Dada la implicación de la fosforilación en treonina 18 de p53 en la disminución de su interacción con el regulador negativo Mdm2, es tentativo pensar que ese fenómeno desencadenado por la fosforilación directa de VRK1 sobre p53, podría ser el responsable de su acumulación. Aunque *in vitro* la interrupción de esa interacción es clara tras fosforilación por VRK1, en los experimentos de cotransfección no parece ser este el mecanismo más determinante o al menos el único. VRK1 es capaz también de inducir la estabilización de p53 en una línea celular sin Mdm2 y la ubiquitinación de p53 por Mdm2 no parece estar afectada en presencia de VRK1, aunque se ha descrito ubiquitinación y degradación de p53 dependiente de Mdm2 en ausencia de unión directa (Inoue et al., 2001). Tras la sobre-expresión de VRK1, en nuestro sistema tan sólo se puede observar una ligera disminución en la cantidad de Mdm2 unido a p53. El que p53 sea susceptible de acumulación por bloqueo de la degradación en el proteosoma a través de inhibidores específicos como el MG132 o la lactacistina, incluso en esta línea sin Mdm2, nos indica la presencia de otros mecanismos de poliubiquitinación y degradación independientes de Mdm2. Entre estos pueden estar otras ubiquitinas ligasa conocidas para p53 como COP1 o Pirh2 (Dornan et al., 2004; Leng et al., 2003) u otras desconocidas. VRK1 es incapaz de promover un aumento aun mayor de los niveles de p53 que el alcanzado con estos inhibidores, y esto podría estar indicándonos que ejerce su efecto también a través de un mecanismo de inhibición de la degradación. Estas otras ubiquitina-ligasas interaccionan con p53 a través de dominios distintos al amino terminal por lo que, en el caso de que VRK1 estuviera provocando una interrupción en la acción de estas, explicarían también la acumulación del mutante p53T18A, que tiene afectada intrínsecamente su degradación por Mdm2 pero no por otras enzimas. Esto implicaría que este mecanismo de acción de VRK1 fuera independiente de la fosforilación directa de p53 en treonina 18.

El que la interrupción de la interacción de p53 con Mdm2 mediante la fosforilación en treonina 18 no sea el mecanismo responsable de la estabilización de p53 por VRK1, no excluye que este pueda tener algún papel en la activación

del supresor de tumores. Normalmente diversas señales confluyen para conseguir una activación y respuesta completa al daño mediada por p53. Varias fosforilaciones y efectos cooperan normalmente para alcanzar una activación completa. La fosforilación de p53 en treonina 18 por VRK1 puede ser sólo una de los efectos desencadenados por la quinasa para la estabilización de p53, cuya relevancia dependerá de la situación concreta.

Datos genéticos han puesto al descubierto el papel de MdmX como regulador negativo de p53, aunque este no parece promover su degradación (Michael and Oren, 2002; Parant et al., 2001). Sin embargo MdmX promueve la estabilización de p53 cuando es sobre-expresado en líneas celulares (Mancini et al., 2004; Stad et al., 2001). Podría ser que en la acción de VRK1 en la línea derivada del doble KO sin Mdm2 estuviera involucrada la liberación de la actividad trans-represora de MdmX, sustituyendo a Mdm2 como regulador negativo de p53. Este extremo es improbable puesto que hemos visto que VRK1 aumenta la actividad de MdmX como activador y no represor de p53. Ambas proteínas parecen actuar sobre p53 por diferentes vías, aunque no excluimos una posible colaboración entre ellas.

Se ha propuesto que ciertas quinasas se activan o realizan su función acercándose a sus sustratos mediante la unión transitoria a sitios de anclaje ("docking-sites" en inglés) en otras proteínas (Biondi et al., 2002; Nolen et al., 2004). De este modo la fosforilación de esas proteínas a las que se mantiene anclada la quinasa no es más que la consecuencia de la liberación de la interacción, que ocurre normalmente con la hidrólisis de ATP. La fosforilación de esos sustratos no es más que un evento secundario que permite la interacción transitoria de la quinasa, que de esta forma ve activada su función específica o se sitúa cerca de otros sustratos menos accesibles. Este podría ser el caso de VRK1 y p53. La fosforilación de este podría tener un papel secundario pero permitiría la unión transitoria de VRK1 a la molécula, que de este modo podría

interaccionar con otras para promover de forma indirecta la estabilización de p53. Esto también explicaría la estabilización del mutante treonina 18A.

Nosotros pensamos que diferentes mecanismos pueden actuar en conjunción. La fosforilación de p53 en treonina 18 inducida por VRK1 dificulta la interacción de este con Mdm2, a la vez que promueve la unión del coactivador p300 y la acetilación de p53 con su consiguiente activación transcripcional. Al mismo tiempo la unión transitoria de VRK1 con p53 promueve la fosforilación de otras proteínas reguladoras no identificadas por el momento que llevan a la activación del supresor de tumores.

VRK1 y su función fisiológica en la célula

Los datos de supresión de la expresión de VRK1 por RNAi, así como los de expresión en tumores y la expresión en desarrollo hematopoyético murino nos sitúan a VRK1 como implicada en algún tipo de regulación de la proliferación celular normal. Aun no sabemos específicamente el proceso en el cual está implicada. Los cultivos en los que se ha suprimido la expresión de VRK1 transitoriamente muestran niveles normales de ciclina B1 y de la quinasa mitótica humana cdc2 indicando que las señales de entrada a mitosis parecen ser normales. La iniciación de la mitosis se lleva a cabo en la mayoría de los casos a juzgar por los datos de “time-lapse” y video-microscopía, pero esta o es anormal o no llega a término. Los niveles de p53 también se mantienen similares a los controles en ausencia de VRK1. Las anomalías en la división celular observadas deberían constituir suficiente estrés para activar a p53, pero los niveles de este son estables y relativamente en ausencia de VRK1. La ausencia de esta activación, reflejada en la no acumulación de p53, podría ser debida a la disminución en los niveles normales de VRK1, aunque esto es un dato por confirmar.

Aunque VRK1 se presenta en nuestro sistema experimental como activador de p53 e inductor de su actividad transactivadora, los datos obtenidos hasta el momento nos llevan a descartar un papel para VRK1 en la activación de p53 en respuesta a estrés severo, como daño al ADN. Los ensayos de supresión de focos transformantes descartan la posible función supresora de tumores de VRK1, que podría tener si su acción sobre p53 en ese sentido fuera definitiva. La mera sobre-expresión de VRK1 en las células con p53 silvestre tampoco conduce a un fenotipo concordante con la actividad supresora de p53, es decir, la inducción de apoptosis o parada de ciclo celular. p53 no sólo ha sido implicada en la respuesta a estrés celular severo, sino que desempeña también importantes funciones durante la diferenciación celular o en el control de eventos esenciales durante la proliferación normal en condiciones fisiológicas como la reparación de daños al ADN durante replicación. Deben existir mecanismos que posibiliten una activación basal de p53 en estas condiciones sin que se dispare una respuesta completa que podría resultar fatal y llevar a la muerte celular, en circunstancias en las que no es necesaria, por tratarse de un daño celular menor. Nosotros proponemos un modelo de acción de VRK1 sobre p53 en el que bajo condiciones fisiológicas sin estrés, la conexión VRK1-p53 podría funcionar como un mecanismo básico que mantiene un nivel basal de p53 en un estado latente pero listo para responder rápidamente a cualquier señal de daño (Fig. 43).

VRK1 podría inducir una activación inicial de p53 no suficiente para disparar una respuesta completa, pero suficiente para responder a los daños mínimos, como bloqueos de la replicación durante la proliferación normal, y que posibilitaría la activación total de p53 en caso de daño severo durante la división celular. Esta activación menor de p53 por VRK1 podría ayudar también en el mantenimiento de un nivel basal de expresión de p53. Cuando ocurren daños severos como los causados por exposición a radiación o agentes quimioterapéuticos, se activan mecanismos adicionales de activación de p53 que desencadenan otros efectos además de reparación, como son parada de ciclo celular o apoptosis en caso de daño muy severo e irreparable. Varias moléculas



Figura 43. Modelo de la acción de VRK1 sobre p53. VRK1 actuaría sobre p53 en su acción durante la proliferación celular normal (panel azul). Ante un estrés severo, otros mecanismos desencadenan una respuesta de p53 completa (panel rojo).

VRK1 debe desempeñar funciones adicionales en proliferación, distintas a la activación de p53 y mediadas por otras moléculas efectoras. Esto se muestra por ejemplo en el que niveles altos de VRK1 estén presentes en células sin p53 (como es el caso de la línea celular H1299) sin que se produzca ningún fenotipo

claro asociado a proliferación similar al que se produce en ausencia de VRK1. Se conocen otros sustratos para VRK1, algunos de ellos relacionados también con proliferación y control de estrés celular. Por ejemplo, VRK1 fosforila al factor de transcripción ATF2, también implicado en control de crecimiento celular, diferenciación y respuesta a estrés (Sevilla et al., 2004b). Por lo tanto las funciones fisiológicas de VRK1 podrían ser complejas y diferentes según el tipo celular y estado de las células.

Atendiendo a la expresión de los genes de la familia VRK en el desarrollo del ratón encontramos generalmente un patrón de expresión similar en los tres genes. Esto podría ser una indicación de una posible redundancia de funciones, lo que a su vez dificultaría futuros experimentos *in vivo* de supresión génica en ratones.

Los altos niveles de expresión de estas proteínas durante el desarrollo podrían señalar un posible papel en diferenciación o proliferación celular en estas tempranas fases. El pico de expresión en órganos fetales coincide entre los días 11.5 y 13.5 del desarrollo. En el caso del hígado fetal, por ejemplo, este coincide con el tiempo en el que el hígado sufre una mayor expansión en el número de células, con ciclos celulares muy cortos y más de 20 duplicaciones celulares en tres días (Vega et al., 2003). Esto es además consistente con un mayor nivel de expresión en el hígado en regeneración y hepatomas, sugiriendo que en este tipo celular la expresión de VRK1 esta asociada con el incremento en el número de células. Sin embargo también se detecta alta expresión en el hígado adulto de ratón, donde no hay proliferación celular considerable, lo que refleja que el papel de estas quinasas en la biología celular es más complejo.

A parte de en proliferación, estas quinasas podrían tener alguna función en diferenciación y, visto los altos niveles de expresión detectados, podrían resultar esenciales y tener un fenotipo de letalidad embrionaria en el caso de supresión genética en ratón. También p53 ha sido implicado en control de la

diferenciación, y podría darse una conexión con VRK1 también en estos procesos.

La regulación de la actividad de VRK1

La expresión ubicua de VRK1 en las células a lo largo de todo el ciclo, sin cambios aparentes, nos hace pensar que debe existir una regulación de su actividad más allá de su expresión. Tampoco esta parece alterada previamente a la estabilización de p53 tras daño al ADN u otros estreses. Aunque con este estudio la situamos como implicada en procesos proliferativos, la expresión de VRK1 también es alta en células en reposo. Esto quiere decir que o bien esta desempeñando nuevas funciones en estas células, o se encuentra en un estado latente inactiva. Si este último es el caso, ciclaría entre el estado inactivo y un estado activado durante proliferación. En la regulación de la actividad de VRK1 podrían estar involucradas la unión a reguladores específicos, la regulación de la actividad por fosforilación o la activación por unión específica a sus sustratos.

VRK1 parece ser una proteína muy estable, tal como se observa en experimentos con el uso de cicloheximida para inhibir la transcripción *de novo*. El que el mutante en el residuo lisina 179, inactivo como quinasa, sea mucho menos estable nos podría indicar un papel importante de la fosforilación por VRK1 en la regulación de su propia actividad. No se puede descartar una inestabilidad intrínseca de la proteína mutante, aunque la proteína recombinante expresada en bacterias no parece tener ningún problema de integridad o estabilidad. VRK1 es fosforilada en multitud de residuos de serina y treonina *in vitro*. De ellos, no se sabe cuales son realmente fosforilados *in vivo* ni la relevancia de su fosforilación y sólo en dos de ellos, la treonina 355 y la 390, se han detectado cambios en el mapa de fosfopéptidos cuando son mutados a alanina (Barcia et al., 2002). VRK1 sufre una intensa auto-fosforilación *in vitro*. La auto-fosforilación juega un papel fundamental en la regulación de la actividad de algunas proteínas quinasa importantes en señalización siendo en algunos casos inhibitoria y en otros

activadora (Nolen et al., 2004). Por ejemplo el dominio carboxilo terminal de la isoforma de caseína quinasa I- δ , lejanamente relacionada con VRK1, contiene un dominio auto-inhibitorio por fosforilación (Graves and Roach, 1995). En nuestro caso, la auto-fosforilación de VRK1 no afecta a su actividad enzimática *in vitro* sobre el sustrato p53, por lo que no parece ser inhibitoria para su actividad *per se*, aunque podría regular *in vivo* la interacción con otras proteínas o tener un papel activador (Barcia et al., 2002). La obtención de la estructura cristalográfica de VRK1 en un futuro nos dará nuevos sobre la posible regulación de su actividad y de el papel de la fosforilación en ella.

Los resultados experimentales con la sobre-expresión de p53 y VRK1 dan indicios de una posible regulación de la actividad de VRK1 por p53, probablemente a través de cambios en su estabilidad. Este fenómeno no es dependiente de Mdm2 o la degradación por el proteosoma. Aunque el mecanismo no está desentrañado aun, probablemente incluya cambios en el estado de fosforilación o la actividad fosforiladora de VRK1, provocados por algún efector de p53, que regulen la estabilidad de la proteína, ya que esta se encuentra muy disminuida en el mutante quinasa inactivo de VRK1. Esta regulación negativa no ha sido observada aun en la proteína endógena. Desconocemos la causa de esta diferencia de regulación entre una y otra, pero descartamos que se trate de un artefacto de la experimentación dado que parece ser un fenómeno bastante específico y general en diversas líneas celulares y situaciones, como por ejemplo el que se vea interrumpido por Mdm2, regulador negativo de p53. Este modelo de regulación podría resultar muy atractivo, ya que se conocen otros mecanismos similares de regulación de la acción de p53 que aseguran que la activación de este sea transitoria en el tiempo y finamente regulada, como ocurre con Mdm2 o p14^{ARF} (Stott et al., 1998; Wu et al., 1993). Este extremo es de vital importancia dadas las dramáticas consecuencias para la células de una activación total de p53 cuando no es necesaria, pudiéndose producir incluso la muerte celular por apoptosis (Fig. 44). Así mismo, nuestros

datos sitúan a VRK1 como esencial en el proceso de proliferación celular, por lo que un efecto supresor de la proliferación por parte de p53 se podría ver beneficiado de una regulación negativa de la actividad de la quinasa. Nuevos datos sobre la regulación de la actividad de VRK1 serán necesarios para descubrir la verdadera importancia fisiológica de este mecanismo.

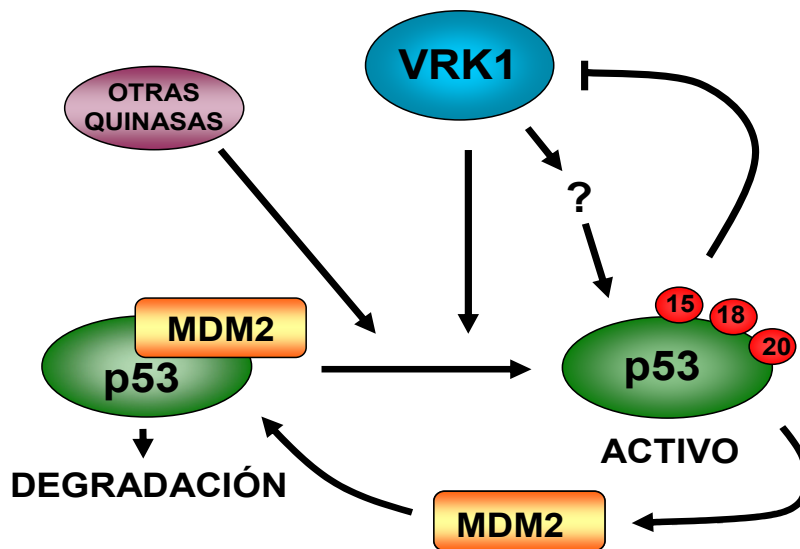


Figura 44. Modelo de regulación entre VRK1 y p53. VRK1 participaría en la activación de p53 mediante la fosforilación en treonina 18 y algún otro mecanismo desconocido. Una vez activado, p53 hace transitoria su propia activación por medio de la regulación negativa de reguladores positivos como VRK1 y de la activación de reguladores negativos como Mdm2.

VRK1 en cáncer

Desde su identificación inicial se postuló como función de la familia de quinasas VRK la de reguladora de la proliferación y crecimiento celular, con el consiguiente posible papel en tumorigénesis. Inicialmente los datos de pérdida de heterocigosidad en marcadores en la región cromosómica 14q32, flanqueando el gen de VRK1, sugerían la presencia de un supresor de tumores y posteriormente también lo sugería el aparecer como regulador positivo de la actividad de p53.

Sin embargo hemos demostrado que VRK1 no tiene función supresora de tumores *per se*. Disfunciones o daño en genes de quinasas activadoras de p53 deberían ser manifestadas clínicamente como una predisposición a la formación de tumores como es el caso de ATM (Shiloh and Kastan, 2001), ATR (Menoyo et al., 2001) o Chk2 (Wu et al., 2001). Fenotípicamente, VRK1 debería mostrar las características de un gen de susceptibilidad tumoral, ya que su efecto es positivo sobre p53. Sin embargo este no parece ser el caso. Niveles altos de VRK1 en ciertos tumores se pueden observar correlacionando con niveles altos de p53 y, sobre todo, con niveles altos de genes de respuesta a p53 como p21 y Mdm2, aunque no sabemos el estatus del gen p53 en estos casos en cuanto a mutaciones. Sin embargo mejores correlaciones son obtenidas con marcadores tumorales y de proliferación típicos como Ki-67, CDK4, survivina o CDC2. No se han detectado mutaciones en el gen de VRK1 en cáncer, pero no sabemos como están afectadas las vías de señalización en las que estará implicada en estos tumores. También hemos detectado los niveles más altos de expresión de VRK1 en tejidos proliferativos y, dentro de los tumores, en las zonas de proliferación activa.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por medio de la supresión de la expresión de VRK1 con RNAi. En estos ensayos VRK1 parece tener un papel esencial en la regulación de la proliferación celular y sugieren que las mutaciones inactivantes en tejidos proliferativos serían letales. Las sobre-expresiones sin embargo no conducen a un fenotipo tumoral por lo que VRK1 no tiene poder oncogénico. No sabemos nada de sus funciones en células en reposo, que no se están dividiendo, en las que también se expresa de forma alta. Todos estos datos hacen pensar en VRK1 como un buen marcador de proliferación más que como supresor tumoral.

CONCLUSIONES

- VRK1 es una quinasa nuclear expresada intensamente en numerosos tejidos y con una expresión constitutiva a lo largo del ciclo.
- La sobre-expresión de VRK1 provoca la estabilización de la proteína p53 promoviendo su fosforilación, acetilación, acumulación nuclear y actividad transactivadora sobre genes diana específicos.
- Los datos experimentales sitúan a VRK1 como regulador en procesos de proliferación celular, y es en estos procesos en los que podría ejercer su acción sobre p53.
- VRK1 se expresa a diferentes niveles en tumores, y su expresión correlaciona positivamente con la de diversos marcadores proliferativos.
- La expresión de la familia de quinasas VRK de ratón se encuentra también regulada durante el desarrollo hematopoyético.

—REFERENCIAS—

- Ahn, J., Urist, M. and Prives, C. (2003) Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem*, **278**, 20480-20489.
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmuller, L. and Deppert, W. (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, **18**, 7706-7717.
- Appella, E. and Anderson, C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, **268**, 2764-2772.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (1999) Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **19**, 1751-1758.
- Ashcroft, M., Taya, Y. and Vousden, K.H. (2000) Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol*, **20**, 3224-3233.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, **2**, 420-430.
- Attardi, L.D., de Vries, A. and Jacks, T. (2004) Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, **23**, 973-980.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y. and et al. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**, 217-221.
- Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K. and Vogelstein, B. (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, **249**, 912-915.
- Bando, T., Kato, Y., Ihara, Y., Yamagishi, F., Tsukada, K. and Isobe, M. (1999) Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, **111**, 161-165.
- Banham, A.H. and Smith, G.L. (1992) Vaccinia virus B1R encodes a 34-kDa Serine/Threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions. *Virology*, **191**, 803-812.
- Barcia, R., Lopez-Borges, S., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2002) Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch Biochem Biophys*, **399**, 1-5.
- Bates, S. and Vousden, K.H. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 28-37.
- Biondi, R.M., Komander, D., Thomas, C.C., Lizcano, J.M., Deak, M., Alessi, D.R. and van Aalten, D.M. (2002) High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *Embo J*, **21**, 4219-4228.
- Blagosklonny, M.V. (2004) Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene*, **23**, 2967-2975.
- Blasco, M.A. (2003) Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur J Cell Biol*, **82**, 441-446.

-
- Blattner, C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H.J. and Herrlich, P. (1999) DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene*, **18**, 1723-1732.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-365.
- Bond, J., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D. and Wyllie, F. (1996) Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene*, **13**, 2097-2104.
- Bottger, V., Bottger, A., Garcia-Echeverria, C., Ramos, Y., van der Eb, A., Jochemsem, A.G. and Lane, D.P. (1999) Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene*, **18**, 189-199.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y. and Jacks, T. (2000) An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol*, **2**, 563-568.
- Boyle, K.A. and Traktman, P. (2004) Members of a novel family of mammalian protein kinases complement the DNA-negative phenotype of a vaccinia virus ts mutant defective in the B1 kinase. *J Virol*, **78**, 1992-2005.
- Brooks, C.L. and Gu, W. (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 164-171.
- Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. and Ronai, Z. (2000) SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*, **101**, 753-762.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 910-917.
- Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science*, **265**, 386-391.
- Cory, S. and Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Courtois, S., Fromentel, C.C. and Hainaut, P. (2004) p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene*, **23**, 631-638.
- Craig, A., Scott, M., Burch, L., Smith, G., Ball, K. and Hupp, T. (2003) Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *EMBO Rep*, **4**, 787-792.
- Craig, A.L., Burch, L., Vojtesek, B., Mikutowska, J., Thompson, A. and Hupp, T.R. (1999) Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J*, **342** (Pt 1), 133-141.
- Cregan, S.P., Dawson, V.L. and Slack, R.S. (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, **23**, 2785-2796.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. and MacDonald, I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-572.

-
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, **401**, 616-620.
- Chan, T.A., Hwang, P.M., Hermeking, H., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2000) Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev*, **14**, 1584-1588.
- Chao, C., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E. and Xu, Y. (2000) Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11936-11941.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D. (1999) Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13777-13782.
- Chène, P. (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 102-109.
- Chernov, M.V., Bean, L.J., Lerner, N. and Stark, G.R. (2001) Regulation of ubiquitination and degradation of p53 in unstressed cells through C-terminal phosphorylation. *J Biol Chem*, **276**, 31819-31824.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, **303**, 1010-1014.
- Damalas, A., Ben-Ze'ev, A., Simcha, I., Shtutman, M., Martinez Leal, J.F., Zhurinsky, J., Geiger, B. and Oren, M. (1999) Excess B-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO Journal*, **18 No.11**, 3054-3063.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death. Critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W. and Old, L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2420-2424.
- Dhillon, N. and Hoekstra, M.F. (1994) Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *Embo J*, **13**, 2777-2788.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K. and Wahl, G.M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, **8**, 2540-2551.
- Dornan, D. and Hupp, T.R. (2001) Inhibition of p53-dependent transcription by BOX-I phospho-peptide mimetics that bind to p300. *EMBO Rep*, **2**, 139-144.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J. and Hupp, T.R. (2003a) The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional

-
- coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol*, **23**, 8846-8861.
- Dornan, D., Shimizu, H., Perkins, N.D. and Hupp, T.R. (2003b) DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300. *J Biol Chem*, **278**, 13431-13441.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. and Dixit, V.M. (2004) The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, **429**, 86-92.
- Downward, J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 11-22.
- Dumaz, N., DM, M. and DW., M. (1999) Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Letters*, **463**, 312-316.
- Dumaz, N. and Meek, D.W. (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, **18**, 7002-7010.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. and Oren, M. (1989) Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8763-8767.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-348.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. and Parkin, D. (2001) GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press, Lyon.
- Flotow, H., Graves, P.R., Wang, A.Q., Fiol, C.J., Roeske, R.W. and Roach, P.J. (1990) Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem*, **265**, 14264-14269.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. and Ronai, Z. (1998) JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*, **12**, 2658-2663.
- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. and Stratton, M.R. (2004) A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*, **4**, 177-183.
- Geyer, R.K., Yu, Z.K. and Maki, C.G. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol*, **2**, 569-573.
- Graves, P.R. and Roach, P.J. (1995) Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem*, **270**, 21689-21694.
- Green, D.R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, **102**, 1-4.
- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**, 342-344.

-
- Grossman, S.R., Perez, M., Kung, A.L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.X., Kumar, S., Howley, P.M. and Livingston, D.M. (1998) p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell*, **2**, 405-415.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 331-341.
- Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, **77**, 81-137.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H. and Oren, M. (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev*, **9**, 2170-2183.
- Hay, T.J. and Meek, D.W. (2000) Multiple phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Letters*, **478**, 183-186.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, **1**, 3-11.
- Hirao, A., Kong, Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. and Mak, T.W. (2000) DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-1827.
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. and Andrews, B. (1997) Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 581-586.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Hoshi, M., Otagiri, N., Shiwaku, H.O., Asakawa, S., Shimizu, N., Kaneko, Y., Ohi, R., Hayashi, Y. and Horii, A. (2000) Detailed deletion mapping of

-
- chromosome band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. *Br J Cancer*, **82**, 1801-1807.
- Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, **50**, 823-829.
- Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell*, **88**, 333-346.
- Hupp, T.R., Sparks, A. and Lane, D.P. (1995) Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*, **83**, 237-245.
- Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P. and Lee, J.M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2147-2152.
- Inoue, T., Geyer, R.K., Howard, D., Yu, Z.K. and Maki, C.G. (2001) MDM2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding. *J Biol Chem*, **276**, 45255-45260.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. and Yao, T.P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J*, **20**, 1331-1340.
- Jaattela, M. (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*, **23**, 2746-2756.
- Jabbur, J.R., Tabor, A.D., Cheng, X., Wang, H., Uesugi, M., Lozano, G. and Zhang, W. (2002) Mdm-2 binding and TAF(II)31 recruitment is regulated by hydrogen bond disruption between the p53 residues Thr18 and Asp21. *Oncogene*, **21**, 7100-7113.
- Jabbur, J.R. and Zhang, W. (2002) p53 Antiproliferative function is enhanced by aspartate substitution at threonine 18 and serine 20. *Cancer Biol Ther*, **1**, 277-283.
- Jackson, M.W., Agarwal, M.K., Agarwal, M.L., Agarwal, A., Stanhope-Baker, P., Williams, B.R. and Stark, G.R. (2004) Limited role of N-terminal phosphoserine residues in the activation of transcription by p53. *Oncogene*, **23**, 4477-4487.
- Johnson, G.L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**, 1911-1912.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. and Bradley, A. (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, **378**, 206-208.
- Jordan, J.D., Landau, E.M. and Iyengar, R. (2000) Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell*, **103**, 193-200.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231-237.
- Karin, M. and Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, **5**, 747-757.

-
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, **252**, 1708-1711.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. and Schindler, C.W. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, **285**, 1-24.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, **31**, 472-483.
- Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1998) Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol*, **18**, 5690-5698.
- Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (1997) Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol*, **17**, 460-468.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kubbutat, M.H.G. and Vousden, K.H. (1998) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol.Med.Today*, **4**, 250-256.
- Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Hollad, J.F. and Frei, E. (eds.). (2003) *Cancer Medicine* 6. BC Decker Inc, Hamilton.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbass, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P. (1996) Structure of the mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, **274**, 948-953.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, Z., Ferry, K.V., Diamond, M.A., Wee, K.E., Kim, Y.B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P.A., Copeland, R.A. and Auger, K.R. (2001) Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem*, **276**, 31357-31367.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Latonen, L., Taya, Y. and Laiho, M. (2001) UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene*, **20**, 6784-6793.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R. and Benchimol, S. (2003) Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*, **112**, 779-791.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649.
- Li, L., Ljungman, M. and Dixon, J.E. (2000) The human Cdc14 Phosphatase Interact with and Dephosphorylate the Tumor Suppressor Protein p53. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 2410-2414.

-
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. and Gu, W. (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, **302**, 1972-1975.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. and Gu, W. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **416**, 648-653.
- Lin, S., Chen, W. and Broyles, S.S. (1992) The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase. *J Virol*, **66**, 2717-2723.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **19**, 1202-1209.
- Lohrum, M.A., Woods, D.B., Ludwig, R.L., Balint, E. and Vousden, K.H. (2001) C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol*, **21**, 8521-8532.
- Lopez-Borges, S. and Lazo, P.A. (2000) The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*, **19**, 3656-3664.
- Lundberg, A.S., Hahn, W.C., Gupta, P. and Weinberg, R.A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 705-709.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, **107**, 137-148.
- Lloyd, A.C. (2000) p53: only ARF the story. *Nat Cell Biol*, **2**, E48-50.
- Mancini, F., Gentiletti, F., D'Angelo, M., Giglio, S., Nanni, S., D'Angelo, C., Farsetti, A., Citro, G., Sacchi, A., Pontecorvi, A. and Moretti, F. (2004) MDM4 (MDMX) overexpression enhances stabilization of stress-induced p53 and promotes apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 8169-8180.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Marcos, M.A., Morales-Alcelay, S., Godin, I.E., Dieterlen-Lievre, F., Copin, S.G. and Gaspar, M.L. (1997) Antigenic phenotype and gene expression pattern of lymphohemopoietic progenitors during early mouse ontogeny. *J Immunol*, **158**, 2627-2637.
- Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 169-178.
- May, P. and May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E. and Oren,

-
- M. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*, **15**, 1067-1077.
- Meek, D. (1999) Mechanisms of switching p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, **18**, 7666-7675.
- Meek, D.W. (1998) Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell. Signal*, **10**, 159-166.
- Melchior, F. and Hengst, L. (2002) SUMO-1 and p53. *Cell Cycle*, **1**, 245-249.
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T. and Knight, R.A. (2003) Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*, **28**, 663-670.
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 237-245.
- Menoyo, A., Alazzouzi, H., Espin, E., Armengol, M., Yamamoto, H. and Schwartz, S., Jr. (2001) Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res*, **61**, 7727-7730.
- Michael, D. and Oren, M. (2002) The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 53-59.
- Michael, D. and Oren, M. (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol*, **13**, 49-58.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Minamoto, T., Buschmann, T., Habelhah, H., Matusevich, E., Tahara, H., Boerresen-Dale, A.L., Harris, C., Sidransky, D. and Ronai, Z. (2001) Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors. *Oncogene*, **20**, 3341-3347.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. and Lozano, G. (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, **378**, 203-206.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Denchi, E.L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. and Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*, **3**, 552-558.
- Morrison, D.K., Murakami, M.S. and Cleghon, V. (2000) Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome. *J Cell Biol*, **150**, F57-62.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P.H. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, **188**, 2033-2045.
- Munroe, D.G., Rovinski, B., Bernstein, A. and Benchimol, S. (1988) Loss of a highly conserved domain on p53 as a result of gene deletion during Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene*, **2**, 621-624.
- Mutirangura, A., Pornthanakasem, W., Sriuranpong, V., Supiyaphun, P. and Voravud, N. (1998) Loss of heterozygosity on chromosome 14 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, **78**, 153-156.

-
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14681-14686.
- Nayak, B.K. and Das, G.M. (2002) Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade. *Oncogene*, **21**, 7226-7229.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M.H. and Shimane, M. (1997) Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, **45**, 327-331.
- Nichols, R.J. and Traktman, P. (2003) Characterization of three paralogous members of the mammalian vaccinia related Kinase (VRK) family. *J Biol Chem*.
- Nishimori, H., Shiratsuchi, T., Urano, T., Kimura, Y., Kiyono, K., Tatsumi, K., Yoshida, S., Ono, M., Kuwano, M., Nakamura, Y. and Tokino, T. (1997) A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene*, **15**, 2145-2150.
- Nolen, B., Taylor, S. and Ghosh, G. (2004) Regulation of Protein Kinases; Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Mol Cell*, **15**, 661-675.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N.A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A.G. and Lozano, G. (2001) Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet*, **29**, 92-95.
- PickSley, S.M., Vojtesek, B., Sparks, A. and Lane, D.P. (1994) Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;- fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, **9**, 2523-2529.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, **389**, 300-305.
- Saito, S., Yamaguchi, H., Higashimoto, Y., Chao, C., Xu, Y., Fornace, A.J., Jr., Appella, E. and Anderson, C.W. (2003) Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *J Biol Chem*, **278**, 37536-37544.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) Dna Damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes and Development*, **12**, 2831-2841.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C.W. and Appella, E. (2000) Damage mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 through a cascade mediated by a Casein 1-like Kinase. *JBC*, **275**, 9278-9283.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. and Prendergast, G.C. (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **15**, 887-898.

-
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T. and Lu, X. (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*, **8**, 781-794.
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M. and Abraham, R.T. (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*, **59**, 4375-4382.
- Sarkaria, J.N., Tibbetts, R.S., Busby, E.C., Kennedy, A.P., Hill, D.E. and Abraham, R.T. (1998) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res*, **58**, 4375-4382.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-225.
- Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S. and Fersht, A. (2002) Molecular Mechanism of the Interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol*, **323**, 491.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. and Eick, D. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*, **29**, 397-406.
- Schwartz, D. and Rotter, V. (1998) p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol*, **8**, 325-336.
- Seelos, C. (1997) A critical parameter determining the aging of DNA-calcium-phosphate precipitates. *Anal Biochem*, **245**, 109-111.
- Sellers, W.R. and Kaelin, W.G., Jr. (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, **15**, 3301-3312.
- Sercan, H.O., Sercan, Z.Y., Kizildag, S., Undar, B., Soydan, S. and Sakizli, M. (2000) Consistent loss of heterozygosity at 14Q32 in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **39**, 385-390.
- Sevilla, A., Santos, C.R., Barcia, R., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2004a) c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene*.
- Sevilla, A., Santos, C.R., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2004b) Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK. *J Biol Chem*, **279**, 27458-27465.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. and Iggo, R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*, **12**, 921-930.
- Shay, J.W. and Roninson, I.B. (2004) Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, **23**, 2919-2933.
- Shay, J.W., Zou, Y., Hiyama, E. and Wright, W.E. (2001) Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet*, **10**, 677-685.

-
- Shen, Y. and White, E. (2001) p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*, **82**, 55-84.
- Sherr, C.J. (2004) Principles of tumor suppression. *Cell*, **116**, 235-246.
- Sherr, C.J. and Weber, J.D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr. Op. in Gen. and Dev.*, **10**, 94-99.
- Shieh, S., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. and Der, C.J. (2000) Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*, **10**, 147-154.
- Shiio, Y., Eisenman, R.N., Yi, E.C., Donohoe, S., Goodlett, D.R. and Aebersold, R. (2003) Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J Am Soc Mass Spectrom*, **14**, 696-703.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.
- Shiloh, Y. and Kastan, M.B. (2001) ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res*, **83**, 209-254.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A.M., Kuijk, E., van den Berghe, P.V.E., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J.A. and Plasterk, R.H.A. (2003) RNAi Report for: Simmer:F28B12.3. WormBase, Vol. 2003.
- Sionov, R.V. and Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-6157.
- Slee, E.A., O'Connor, D.J. and Lu, X. (2004) To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*, **23**, 2809-2818.
- Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K. and Jochemsen, A.G. (2001) Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep*, **2**, 1029-1034.
- Steeg, P.S. (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer*, **3**, 55-63.
- Stewart, Z.A., Leach, S.D. and Pietenpol, J.A. (1999) p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol Cell Biol*, **19**, 205-215.
- Stommel, J.M. and Wahl, G.M. (2004) Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *Embo J*, **23**, 1547-1556.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H. and Peters, G. (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J*, **17**, 5001-5014.
- Sun, Y., Zeng, X.R., Wenger, L., Firestein, G.S. and Cheung, H.S. (2004) P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. *J Cell Biochem*, **92**, 258-269.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N.,

-
- Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y. and Imai, K. (2000) p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *Embo J*, **19**, 6517-6526.
- Talis, A.L., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. (1998) The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem*, **273**, 6439-6445.
- Taylor, W.R., Agarwal, M.L., Agarwal, A., Stacey, D.W. and Stark, G.R. (1999a) p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene*, **18**, 283-295.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schonthal, A.H., Katula, K.S. and Stark, G.R. (1999b) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*, **10**, 3607-3622.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tutt, A. and Ashworth, A. (2002) The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med*, **8**, 571-576.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Sionov, R.V., Lozano, G., Oren, M. and Haupt, Y. (1999) Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *The EMBO Journal*, **18**, 1805-1814.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. and Liu, E.A. (2004) In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*.
- Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G. and Benchimol, S. (1997) ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo J*, **16**, 6018-6033.
- Vega, F.M., Gonzalo, P., Gaspar, M.L. and Lazo, P.A. (2003) Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett*, **544**, 176-180.
- Vernell, R., Helin, K. and Muller, H. (2003) Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem*, **278**, 46124-46137.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 489-501.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Vousden, K. and Vande Woude, G.F. (2000) The ins and out of p53. *Nature Cell Biology*, **2**, E178-E180.

-
- Vousden, K.H. (2002) Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 47-59.
- Vousden, K.H. and Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, **2**, 594-604.
- Wang, X., Taplick, J., Geva, N. and Oren, M. (2004) Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett*, **561**, 195-201.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. and Harris, C.C. (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3706-3711.
- Wang, Y.H., Tsay, Y.G., Tan, B.C., Lo, W.Y. and Lee, S.C. (2003) Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J Biol Chem*, **278**, 25568-25576.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. and Halazonetis, T.D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*, **19**, 175-178.
- Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T. and Wynford-Thomas, D. (2000) Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, **20**, 2803-2808.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Wesierska-Gadek, J., Wang, Z.Q. and Schmid, G. (1999) Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res*, **59**, 28-34.
- Weston, C.R. and Davis, R.J. (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 14-21.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, **17**, 141-143.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-1132.
- Wu, X., Webster, S.R. and Chen, J. (2001) Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem*, **276**, 2971-2974.
- Wu, Z., Earle, J., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E. and Xu, Y. (2002) Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **22**, 2441-2449.
- Xirodimas, D.P., Stephen, C.W. and Lane, D.P. (2001) Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res*, **270**, 66-77.
- Yaffe, M.B. and Elia, A.E. (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 131-138.

-
- Yang, J., Yu, Y. and Duerksen-Hughes, P.J. (2003) Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat Res*, **543**, 31-58.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Shioya, H., Utsugisawa, Y., Yokoyama, K., Weichselbaum, R., Shi, Y. and Kufe, D. (1999) Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. *J Biol Chem*, **274**, 1883-1886.
- Zelko, I., Kobayashi, R., Honkakoski, P. and Negishi, M. (1998) Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Arch Biochem Biophys*, **352**, 31-36.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, **292**, 1910-1915.
- Zhou, B.B. and Bartek, J. (2004) Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer*, **4**, 216-225.

Parte del trabajo aquí reseñado ha sido publicado en todo o parte de las publicaciones científicas siguientes, de las que el doctorando es autor principal o coautor:

Barcia, R., Lopez-Borges, S., **Vega, F.M.** and Lazo, P.A. (2002) Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch Biochem Biophys*, **399**, 1-5.

Vega, F. M., Gonzalo, P., Gaspar, M. L. and Lazo, P. A. (2003) Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett.* **544**, 176-80.

Vega, F.M., Sevilla, A. and Lazo, P.A. (2004) p53 stabilization and accumulation induced by the human Vaccinia-related kinase-1 (VRK-1). *Mol Cell Biol.* (En prensa en el momento de la impresión de esta memoria); MCB-02046-03.

—Abreviaturas—

aa: aminoácidos
ADN: ácido desoxiribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADP: del ingles "Adenosine DiPhosphate"
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: del ingles "Adenosine TriPhosphate"
BSA: del ingles "bovine serum albumin". Seroalbumina bovina
Chk: del ingles "checkpoint kinase"
CHX: cicloheximida
CKII: del ingles "casein kinase II"
CS: del ingles "calf serum". Suero de ternera.
DAPI: del ingles "4',6'-DiAmidino-2-PhenylIndol"
DFX: desferrioxamina
D-MEM: del ingles "Dubelco's modified- Minimum Essential Medium"
DTT: DiTioTreitol
EDTA: del ingles "EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid"
FBS: del ingles "Fetal Bovine Serum". Suero fetal bovino
GFP: del ingles "Green Fluorescent Protein"
GST: Glutation-S-Transferasa
GTP: del ingles "Guanosine TriPhosphate"
h: hora
IPTG: IsoPropil- β -D-TioGalactopiranosido
 K_m : Constante de "Michaelis Menten"
KO: del ingles "knock-out"
LB: medio "Luria bertani"
MBP: del ingles "Myelin Basic Protein". Proteína básica de mielina
Mdm2: del ingles "Mouse Double Minute-2"
MEFs: del ingles "Mouse Embryo Fibroblast". Fibroblasto de embrión de ratón
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
mm: milimetro
mM: milimolar
ng: nanogramo
nm: nanometro
°C: grado centígrado
PBS: del ingles "Phosphate Buffer Salinum"
PCR: del ingles "Polimerase Chain Reaction"
PMSF: del ingles "Phenil Methil Sulfonile Fluoride". Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF: del ingles "PolyVinylidene Fluoride"
RB: del ingles "RetinoBlastoma protein"
ROS: del ingles "Reactive Oxygen Species". Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR: del ingles "Reverse Transcriptase PCR"
s: segundo
SDS: del ingles "Sodium Dodecyl Sulfate"
SDS-PAGE: del ingles "SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis"
UV-C: radiación ultravioleta tipo C
v/v: relación volumen/volumen
Wt: del ingles "wild type". Tipo silvestre
x g: veces la fuerza de la gravedad
 μ Ci: microcurio

μg : microgramo
 μl : microlitro
 μM : micromolar

Abreviaturas de aminoácidos

A	Ala	alanina	C	Cys	cisteína
D	Asp	aspartato	E	Glu	glutámico
F	Phe	fenilalanina	G	Gly	glicina
H	His	histidina	I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina	L	Leu	leucina
M	Met	metionina	N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina	Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina	S	Ser	serina
T	Thr	treonina	V	Val	valina
W	Trp	triptófano	Y	Tyr	tirosina

Bases nitrogenadas

A	adenina	C	citosa
U	uracilo	G	guanina
T	timidina		

—Agradecimientos—

Este trabajo, y yo mismo como “científico”, no hubieran sido posibles sin la formación, en lo personal y lo académico, recibida en la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Agradezco a los profesores y compañeros que supieron mantener mi entusiasmo inicial e incluso agrandarlo, y a los que me ensaaron la biología no solo como una ciencia, sino también como un arte y una forma de ser y hacer.

En especial quiero agradecer a Angel Velasco y Josefina Hidalgo por su confianza, apoyo, y enseñanzas en su laboratorio del Departamento de Biología Celular, durante mi estancia allí y después. Y a María por ser mi primera “jefecilla” y enseñármelo todo con infinita paciencia.

A Pedro por confiar en mí y a todos los compañeros de mi laboratorio, presentes y pasados, que me sufrieron estoicamente algunas veces y me lanzaron desafíos otras. Gracias por intentar ser amigos incluso fuera del laboratorio.

A los compañeros del Centro de Investigación del Cáncer, tanto científicos como no, que siempre estuvieron dispuestos a dar toda su ayuda, ideas, reactivos y más. Especialmente a los que, además de alguna enzima, compartieron parte de su tiempo como personas. A Antonio por, además de técnico de microscopía a la medida, ejercer de “Macgiver” particular, psicólogo de cabecera, pesado oficial y causa perdida. A Carlos por poner un punto de cordura, originalidad y diversión a mi vida en el centro. A Jose por ser Gallego y lidiar dignamente con un Andalúz tanto tiempo. A los tres por las excursiones que me devolvían momentáneamente a mi sitio en la naturaleza.

A mis amigos de Sevilla...de siempre, va también dedicado este trabajo. Sin su apoyo, aliento, risas y llamadas intempestivas estos tiempos lejos del sur habrían sido más difíciles.

A Estela por estar siempre a mi lado incondicionalmente y ayudarme y hacerme sonreír en los momentos más difíciles.

A Pako pa lo bueno y pa lo malo; pa la ciencia y pa lo que sea.

A todos los que creían que hacía algo importante: mis padres, mis hermanos, amigos y familia.

A las niñas de Algarive, siempre conmigo. Llevándome de las nubes de la ciencia a la realidad del mundo y de vuelta a las nubes de la utopía.

A la gente de Amauta en Madrid que me hicieron y me hacen sentir como en casa en mi paso por allí.

A Inmita por estar conmigo como científica, como amiga, como todo en los últimos años; probablemente los más dulces, gracias a ella.

Y a mí, porque me ha costado mucho llegar a esta página...

A modo de epílogo

Sirva humildemente este trabajo para animar a aquellos que tienen/tenemos la inquietud de dedicarse a la ciencia pero lo ven demasiado lejos o inalcanzable, y como pequeño homenaje a los que han “sufrido” las condiciones de ser becario o estudiante predoctoral en ciencia en España.

